Über die Bildung der Indolalkaloide Serpentin und Raubasin in Wurzeln und Gewebekulturen von Catharanthus Roseus (L.) G. Don

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ursula Roller
aus Baden-Baden

1978

1977

ÜBER DIE BILDUNG DER INDOLALKALOIDE SERPENTIN UND RAUBASIN IN WURZELN UND GEWEBEKULTUREN VON CATHARANTHUS ROSEUS (L.) G. DON

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Ursula Roller

aus

Baden-Baden

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 1978
Dekan: Prof. Dr. H. Auterhoff
1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Auterhoff

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Mai 1975 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Reinhard am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen begonnen und im Oktober 1977 abgeschlossen.

Für die Übertragung des Themas, die Anregungen und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, danke ich Herrn Prof. Dr. E. Reinhard aufrichtig.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	3
Screening	
Untersuchung von Catharanthus roseus (L.) G. Don auf den Gehalt an Serpentin und Raubasin in den Wurzeln.	3
Extraktion	4
Standardlösungen	5
Chromatographie	6
Quantitative Bestimmung von Serpentin und Raubasin	6
Gewebekulturen	
Anlage der Gewebekulturen	8
Sprossgewebe	
Wurzelgewebe	
Kulturbedingungen	9
Kulturmedien	
Grundmedium nach Murashige und Skoog	11
Medium G_{20}	11
Medium G_{48}	12
Grundmedium nach Nitsch und Nitsch	13
Medium A_R	13
Grundmedium nach White (1943) + 7 % Cocosmilch	14
Medium F_1	14
Regenerationsmedium	16
Chemikalien	17
Apparaturen	17
Trockengewichtsbestimmung	18
Abkürzungen	18
Statistik	18

ERGEBNISSE Seite

Tabellen des Wurzelscreenings

Tabelle 1 19

Tabelle 2 22

Tabelle 3 26

Zusammenfassung der Ergebnisse des Wurzelscreenings 28

Sprossgewebe 29

Medium G_{20}, Ernte nach 5 Wochen 35

Medium A_R, Ernte nach 5 Wochen 37

Medium G_{48}, Ernte nach 5 Wochen 39

Zusammenfassung der Medieneinflüsse G_{20}, A_R, und G_{48} nach 5 Wochen Versuchsdauer 41

Medium G_{20}, Ernte nach 7 Wochen 43

Medium A_R, Ernte nach 7 Wochen 45

Medium G_{48}, Ernte nach 7 Wochen 47

Zusammenfassung der Medieneinflüsse G_{20}, A_R und G_{48} nach 7 Wochen Versuchsdauer 49

Vergleich Medium G_{20}, Ernte nach 5 und 7 Wochen 51

Vergleich Medium A_R, Ernte nach 5 und 7 Wochen 53

Vergleich Medium G_{48}, Ernte nach 5 und 7 Wochen 55

Zusammenfassung der Einwirkung der Versuchsdauer auf die Alkaloidbildung auf den Medien G_{20}, A_R und G_{48} 55

Vergleich zwischen Spross- und Wurzelgewebe auf dem Medium A_R 60

Wurzelgewebe Seite

Medium G_{20} , Ernte nach 5 und 7 Wochen 62

Medium A_R , Ernte nach 5 und 7 Wochen 64

Medium G_{48} , Ernte nach 5 und 7 Wochen 66

Vergleich Spross- und Wurzelgewebe, Medium G_{20} , Ernte nach 5 und 7 Wochen 72

Vergleich Spross- und Wurzelgewebe, Medium A_R , Ernte nach 5 und 7 Wochen 74

Vergleich Spross- und Wurzelgewebe, Medium G_{48} , Ernte nach 5 und 7 Wochen 76

Zusammenfassung der Ergebnisse der Wurzelkulturen 76

Licht-/Dunkelversuche an Sprosskulturen

Licht-/Dunkeleinwirkung mit 1 Passage Abstand 78

Dunkeleinwirkung über 2 Passagen 80

Licht-/Dunkeleinwirkung während 1 Passage 82

Licht-/Lichteinwirkung vor und nach 1 Passage im Dauerdunkel 84

Zusammenfassung der Licht-/Dunkelversuche von Sprossgewebekulturen 84

Wachstum 86

Wachstum auf den Medien G_{20} , A_R und F_1 von Sprosskulturen 86

Wachstum auf dem Medium A_R von Spross- und Wurzelkulturen 89

Zusammenfassung der Einflüsse der Medien F_1 , G_{20} , A_R und G_{48} auf das Wachstum von Spross- und Wurzelkulturen 93

Seite

Serpentinausbeute 95

Serpentinausbeute der Sprosscalli auf den Medien G_{20} , A_R und G_{48} nach 5 und 7 Wochen 95

Serpentinausbeute der Wurzelcalli auf den Medien G_{20} , A_R und G_{48} nach 5 und 7 Wochen 97

ABSCHLIESSENDE ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION 99

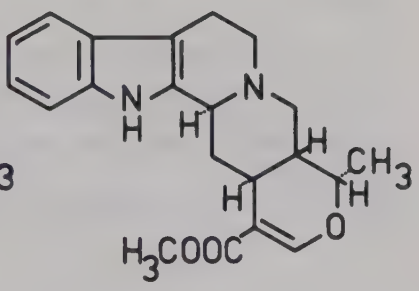
LITERATURVERZEICHNIS 104

EINLEITUNG

Die Apocynacee Catharanthus roseus G. Don, syn. Vinca rosea L. ist in den Tropen und Subtropen weit verbreitet. In der Volksmedizin ausser-europäischer Länder wird dieser Pflanzenart unter anderem eine antidiabetische Wirkung zugeschrieben, jedoch konnten bei genaueren Untersuchungen keine hypoglykämischen Eigenschaften festgestellt werden. Die Isolierung des cytostatisch wirkenden Vinblastins im Jahre 1958 (1) war der Ausgangspunkt intensiver Erforschungen der mehr als 60 Indolalkaloide enthaltenden Catharanthus Art.

Die Alkaloide Serpentin und Raubasin sind sowohl in den Wurzeln als auch in Gewebekulturen von Catharanthus roseus nachzuweisen. Serpentin, bzw. sein Hydrierungsprodukt Raubasin finden in der Therapie des Bluthochdrucks, vor allem in Kombination mit Rauwolfia-Alkaloiden Verwendung.

Serpentin



Raubasin

Gewebekulturen dienen verschiedentlich der Gewinnung sekundärer Stoffwechselprodukte, die arzneiliche Verwendung finden können (2,3,4). Die Induktion einer Callusbildung kann durch chemische und physikalische Schädigung von Pflanzenteilen ausgelöst werden. Es bilden sich Zellverbände, die auf künstlichen Nährmedien unter sterilen Bedingungen unbegrenzt kultiviert werden können.

Zell- und Gewebekulturen von Catharanthus roseus werden an verschiedenen Stellen bereits seit längerer Zeit unter den Gesichtspunkten Wachstum und Entwicklung (5,6,7,8,9), Crown-gall (10), Wirkstoffe (11) und Enzyme (12,13) untersucht.
Verschiedene Arbeitskreise arbeiten an der Gewinnung von Vinca-Alkaloiden aus solchen Gewebekulturen (14,15,16,17,18).

Die Aufgabe vorliegender Arbeit war festzustellen, ob sich zwischen dem Alkaloidbildungsvermögen in der Pflanze und dem der davon angelegten Gewebekultur Parallelen ergeben. Hierzu wurden nach dem Screening von vorhandenem Pflanzenmaterial ausgewählte Calluskulturen unter dem Einfluss verschiedener Nährmedien, unterschiedlicher Versuchsdauer und der Einwirkung von Licht und Dunkel analysiert.

MATERIAL UND METHODEN

S c r e e n i n g:

Untersuchung von Catharanthus roseus (L.) G. Don auf den Gehalt an Serpentin und Raubasin in den Wurzeln.

Untersucht wurden etwa 800 Pflanzen aus Moçambique, Madagaskar und Brasilien.

Die Pflanzen hatten bei der Wurzelabnahme ein Alter von 7, 8 und 13, eine Charge von 33 Monaten. Aus Samen, die 1974 im Gewächshaus in Tübingen ausgesät wurden, wuchsen im Lauf dieser Zeit kleine Catharanthus roseus-Pflanzen mit für eine Ernte ausreichendem Wurzelmaterial. Um einen repräsentativen Durchschnittsgehalt des Wurzelwerks zu ermitteln, gleichzeitig aber ein Überleben der Pflanzen zu garantieren, wurde ungefähr 1/3 der Wurzeln abgenommen, wobei darauf geachtet wurde, daß sowohl dicke Haupt-, als auch feinere Nebenwurzeln geerntet wurden. Die gewaschenen Wurzeln wurden - um eventuelle weitere Enzymaktivitäten zu unterbinden - in Styroporkästen mit Trockeneis transportiert und bei -18^{o} C eingefroren. Nach Gefriertrocknung und Zerkleinerung wurde das Material bis zur Untersuchung in Schnappdeckelgläsern bei einer Temperatur um -18^{o} C aufbewahrt.

Extraktion

Die Extraktbereitung für die Untersuchung der ersten 100 Pflanzen erfolgte durch viermaliges Ausrühren von 100 mg gemahlener Wurzel mit je 10 ml einer Mischung aus 75 ml Aethanol 96 %, 20 ml demineralisiertem Wasser und 5 ml Eisessig pa. Die Lösungen wurden jeweils über ein Seitz-Filter abgesaugt, vereinigt und im Vakuum bei ca. 50° C zur Trockne gebracht. Der gesamte Rückstand wurde zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung in 10 ml Methanol pa aufgenommen.

Da das Ausrühren mit je viermal 30 Minuten für ein Screening von 800 Pflanzen zu zeitraubend erschien, wurde - nachdem die Extraktion mit siedendem Methanol dieselben Ergebnisse lieferte - zu folgender Methode übergegangen:
Für die Extraktion wurden zwischen 50 und 100 mg - je nach Serpentingehalt - gepulverte Wurzel in ein Schliffreagenzglas (ca. 17 x 170 mm mit NS 14,5) eingewogen, genau 10 ml Methanol pa dazu pipettiert und nach Aufsetzen des Rückflusskühlers 15 Min. lang bei leichtem Sieden (Wasserbad ca. 80° C, Eintauchtiefe ungefähr 1 cm) gehalten. Nach dem Abkühlen hat sich das feste Material abgesetzt, und die überstehende Lösung wird für die Bestimmung von Serpentin und Raubasin direkt verwendet. Für die Serpentinbestimmung in den Wurzeln wurde die Extraktlösung im Verhältnis 1:4 verdünnt.

Standardlösungen

Als Standard für die quantitative Bestimmung von Serpentin diente eine Eichlösung von 1,0 mg Serpentinhydrogentartrat purum gelöst in 500 ml Methanol pa.

Für den Raubasinstandard wurde 1,0 mg Ajmalicin purum in 10 ml einer Mischung aus Methanol pa/Chloroform pa 1:1 gelöst. Beide Standardlösungen wurden kühl und im Dunkeln aufbewahrt. Während sich die Serpentinlösung als stabil erwies, wurde die Raubasinlösung jede Woche neu bereitet.

Von diesen Standardlösungen wurden zur quantitativen Bestimmung von Serpentin zweimal 5 µl (=0,02 µg) und zweimal 10 µl (=0,04 µg), zur Bestimmung von Raubasin zweimal 1 µl (=0,2 µg) und zweimal 2 µl (=0,4 µg) zusätzlich zu den Extraktlösungen auf jede DC-Platte aufgetragen. In diesem Konzentrationsbereich ist die Bestimmung reproduzierbar und die gemessene Fluoreszenzintensität linear von den auf die Platte aufgetragenen Mess- bzw. Eichlösungen abhängig. Dadurch wurden auch etwaige Schwankungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, etc.) bei der Entwicklung der Platten abgefangen und berücksichtigt, dass die Fluoreszenzstärke der gleichen Konzentrationen von Platte zu Platte schwanken kann. Sowohl für die Serpentin-, als auch für die Raubasinbestimmung lagen die aufgetragenen Mengen der Wurzel- bzw. Gewebeextrakte im Messbereich der Standardlösungen. Gegebenenfalls wurde die Extraktlösung verdünnt oder konzentriert.

Chromatographie

Chromatographiert wurde mit DC-Fertigplatten Kieselgel 60 "Merck", Nr. 5721, ohne Fluoreszenzindikator.
Für die Bestimmung von Serpentin wurden, neben einer definierten Menge der oben erwähnten Standardlösung zwischen 1 µl und 5 µl Extraktlösung auf die Kieselgelfertigplatten aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte bei Raumtemperatur und Kammersättigung. Fliessmittel war Benzol, Aceton, Diäthylamin 70:20:10, die Laufhöhe betrug 15 cm.
Für die Raubasinbestimmung wurden vom methanolischen Wurzel- bzw. Gewebeextrakt zwischen 5 µl und 20 µl aufgetragen, zusätzlich der entsprechende Standard. Als Fliessmittel diente Xylol, Methyläthylketon 2:1 + 2 % Diäthylamin, die Laufhöhe betrug hier 10 cm.
Die DC-Kammern wurden nach jedem 2. Plattendurchgang mit frischem Laufmittel beschickt.
Die Messwerte, angegeben in % Serpentin resp. % Raubasin / 100 mg Trockengewicht, errechnen sich aus je 4 Messpunkten / Extraktlösung.

Quantitative Bestimmung von Serpentin und Raubasin

Die Messung beider Substanzen erfolgte durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Flecken der Extraktlösungen mit denen der entsprechenden Standardlösungen. Diese Fluoreszenzintensitäten wurden mit einem Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer bei 450 nm gemessen und mit dem linearen Vitatronschreiber UR 400 registriert, dem ein Integrator angeschlossen war. Als Anregungslicht diente die Quecksilberlampe in Ver-

bindung mit dem Sperrfilter 313 nm. Die Dünnschichtplatten wurden quer zur Fliessmittelrichtung unter dem Messgerät durchgefahren. Während Serpentin ohne zusätzliche Behandlung gemessen werden konnte, zeigte Raubasin erst nach zweistündigem Erhitzen im Trockenschrank bei 145° C intensive Eigenfluoreszenz. Bei der Serpentinbestimmung störte jedoch das dicht unter dem Serpentin liegende Alstonin, sodaß dies vor der Messung unter der UV-Lampe mit einem weichen Bleistift überstrichen wurde. Raubasin kam in den Gewebeextrakten in so geringer Menge vor, daß es dann mit Sp = Spur bezeichnet wurde.

Gewebekulturen:

Anlage der Gewebekulturen

Die Anlage der Gewebekulturen erfolgte nach den üblichen Methoden. Ausführliche Beschreibungen hierzu s. KOBLITZ, H. (19).

Sprossgewebe:

Um Sprosskulturen zu errichten wurden von den ausgewählten Pflanzen Stengelstücke abgenommen. Die Stengelabschnitte wurden nach Entfetten (1 Min. in Aethanol 90 %) und Oberflächensterilisation (10 - 20 Min. in Chlorkalklösung 10 %) in dünnen Scheiben auf in Petrischalen ausgegossenen Nähragar gegeben. Unter unten aufgeführten Bedingungen entwickelten sich nach 1 bis 2 Wochen kleine Calli, die, nachdem sie einen Durchmesser von ungefähr 1 bis 2 cm hatten auf festes Nährmedium in Erlenmeyer Kolben, die mit Zellwattestopfen verschlossen waren, gesetzt wurden.

Wurzelgewebe:

In gleicher Weise wurden die entsprechenden Wurzeln behandelt. Diese so angelegten Wurzelkulturen waren allerdings - trotz mehrmaliger Anlage - nicht steril (9), sodaß zur Erstellung von Wurzelkulturen eine andere Lösung gefunden werden mußte. Da aus Stengelabschnitten, die in bidestilliertem Wasser Wurzeln bilden sollten, keine Wurzeln wuchsen, wurde zu folgender Methode übergegangen: (14, 20)

Stengelabschnitte, die wie oben aufgeführt behandelt worden waren, allerdings eine Länge von 2 bis 3 cm hatten, wurden in ein "Regenerationsmedium" und zwar mit dem zur Blüte gerichteten Teil nach oben gesteckt. Darin regenerierten sie (21) zu kleinen Catharanthus roseus Pflanzen mit, wenn auch erst nach langer Zeit gebildeten, kleinen, nunmehr sterilen Wurzeln. Diese konnten wie bei den Sprossstücken beschrieben zur Callusbildung gebracht werden. Aufgrund eben gemachter Ausführungen wurden Wurzelkulturen von nur 4 Pflanzen angelegt, nämlich einer mit hohem, zwei mit mittlerem und einer mit niedrigem Serpentingehalt.

Kulturbedingungen

Die Kulturversuche wurden entweder in Klimaschränken oder im temperierten und beleuchteten Kulturraum bei 26° C durchgeführt. Auch in den Klimaschränken konnten die Gewebekulturen beleuchtet werden, wobei sich die dazu notwendigen Leuchtstoffröhren in einem vom Kulturraum durch eine Thermopenglasscheibe getrennten, eigens durch Ventilatoren gekühlten Lampenraum befinden. Als Lichtquelle dienten 6 Osram-L-Fluora-40 W / 77 Leuchtstoffröhren. Das von diesen Lampen emittierte Licht zeichnet sich durch einen hohen Anteil an blauer und roter Strahlung aus und hat sich bei Gewebekulturversuchen gut bewährt. Die Lichtversuche wurden im Dauerlicht bei 2000 Lux durchgeführt.
Die Calli wurden in 300 ml Erlenmeyer Kolben, verschlossen mit Zellwattestopfen kultiviert. Jeder Kolben enthält 100 ml Nähragar.

Für die Versuche wurde vier Wochen altes Gewebe verwendet, von dem pro Kolben jeweils zwischen 1,0 und 1,4 Gramm genau eingewogen wurde. Eine genaue Einwaage ist erforderlich, weil die Zuwachsrate von der Menge des eingewogenen Gewebes abhängig ist (22, 23). Das Gewebe wurde möglichst gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. Für die Erhaltung wurden die Gewebe alle 4 Wochen auf neues Medium umgesetzt.

Kulturmedien

Die folgenden Medien wurden verwendet:

Vollsynthetisches Medium nach Murashige und Skoog (1962), (24)

1 L Nährlösung enthält in mg:

NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Fe-EDTA	42,8
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4 \cdot H_2O$	18,4
$ZnSO_4$	6,0
KJ	0,83
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0,25
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,025
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,025
Glycin	2,0
Caseinhydrolysat	1000
meso-Inosit	100
Nicotinsäure	0,5
Pyridoxin - HCl	0,5
Thiamin - HCl	0,1
Saccharose	30 g

Medium G_{20}:	+ Kinetin	2,0
	+ IAA	0,2
	- Caseinhydrolysat	
	Für Oberflächenkulturen	
	+ Agar	13 g

Vor dem Autoklavieren des Mediums wurde mit 0,5 n KOH der pH-Wert auf 5,5 eingestellt.
Auf diesem Medium erfolgte die Anlage der Calluskulturen. Zur Induktion der Callusbildung aus Stengelabschnitten und Wurzeln wurde daher für die ersten 2 bis 3 Passagen 1 mg/L 2,4-D zugesetzt.

Das Medium G_{48} stellt eine weitere Modifikation des Murashige und Skoog Grundmediums dar.

Medium G_{48} :	+ Kinetin	2,0
	+ IAA	0,2
	+ 2,4 - D	0,1
	- Caseinhydrolysat	
	Für Oberflächenkulturen	
	+ Agar	9 g

Außerdem wurde der Zusatz von Saccharose auf 20 g / L reduziert.

Vollsynthetisches Medium nach Nitsch und Nitsch (1969), (25)

1 L Nährlösung enthält in mg:

KNO_3	950
NH_4NO_3	720
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	185
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	220
KH_2PO_4	68
$MnSO_4 \cdot H_2O$	18,9
H_3BO_3	10
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	10
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,25
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,025
Fe-EDTA	40,1
meso-Inosit	100
Glycin	2,0
Nicotinsäure	5,0
Pyridoxin - HCl	0,5
Thiamin - HCl	0,5
Biotin	0,05
Folsäure	0,5
Saccharose	20 g

Medium A_R :

+ Kinetin	0,2
+ IAA	20,0

Bei Oberflächenkulturen

+ Agar	10 g

Vor dem Autoklavieren des Mediums wurde mit 0,5 n KOH der pH-Wert auf 5,5 eingestellt.

Halbsynthetisches Medium F_1 nach White (1943) + 7 % Cocosmilch (26)

1 L Nährlösung enthält in mg:

$NaSO_4$	800
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$	576
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	369
KNO_3	80
KCl	65
NaH_2PO_4	37,95
Fe-EDTA	40
$MnSO_4$	5,4
$ZnSO_4$	10,86
H_3BO_3	0,375
KJ	3,0
Thiamin - HCl	0,1
Kinetin	0,2
NAA	2,0
Cocosmilch[+)]	70 g
Saccharose	20 g
Bei Oberflächenkulturen	
+ Agar	6,5 g

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert des Mediums mit 0,5 n KOH auf 5,5 eingestellt.

+) Die Cocosmilch wurde abgekocht, filtriert und bis zur Verwendung in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Da es sich hierbei um kein vollsynthetisches Medium handelte, wurde es nur für einen Versuch verwendet. Allerdings wuchsen hier, verglichen mit den Medien G_{20} und A_R die Calli am besten, sodaß es zur Erhaltung der Kulturen zunächst gut geeignet erschien. Dies bestätigt die Ergebnisse von CAREW (27), der auf einem modifizierten Medium nach White mit Cocosmilch und 2,4 - D als Wuchsstoff gutes Gewebewachstum beobachtete. Wie weitere Versuche ergaben, zeigten die Gewebekulturen auf dem vorn erwähnten Medium G_{48} ein noch besseres Wachstum und ebenso gutes Aussehen, sodaß später dieses Medium für die Erhaltung der Kulturen verwendet wurde.

Regenerationsmedium für die Wurzelbildung aus Stengelabschnitten verändert nach Corduan für Digitalis purpurea Callus von Antheren nach Nitsch und Nitsch (25).

1 L Nährlösung enthält in mg:

KNO_3	950
NH_4NO_3	720
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	185
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	220
KH_2PO_4	68
$MnSO_4 \cdot H_2O$	18,9
H_3BO_3	10
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	10
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,25
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,025
Fe-EDTA	40,1
meso-Inosit	100
Glycin	2,0
Nicotinsäure	5,0
Pyridoxin - HCl	0,5
Thiamin - HCl	0,5
Biotin	0,05
IAA	0,1
Kinetin	0,3
N-Z-Amine Typ A+)	1,0
Folsäure	0,5
Saccharose	20 g
Bei Oberflächenkulturen	
+ Agar	9 g

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert des Mediums mit 0,5 n KOH auf 5,5 eingestellt.

+) Die N-Z-Amine wurden uns vom Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

Chemikalien

Fluka AG Buchs:

2,4 - Dichlorphenoxyessigsäure purum

Serpentinhydrogentartrat purum

Raubasin purum

Merck Darmstadt:

DC-Fertigplatten Nr. 5721, ohne Fluoreszenzindikator

alle weiteren Substanzen

Die Kulturmedien und wässrigen Lösungen wurden mit Aqua bidestillata bereitet. Von den einzelnen Chemikalien wurden konzentrierte Stammlösungen angesetzt und in den erforderlichen Mengen bei der Bereitung eines Nährmediums zugegeben. Das fertige Medium wurde in die Kulturgefässe ausgegossen und für 20 Minuten bei 120° C und 1,2 atü autoklaviert.

Apparaturen

Gefriertrocknung

Christ, Delta 1; 72 Stdn. bei + 5° C bis - 20° C.

Zerkleinerung

Mikroschlagmühle "Culatti" unter Verwendung eines Siebes mit 1 mm Lochdurchmesser.

Trockengewichtsbestimmung

Zur Bestimmung des Trockengewichts wurde das gefriergetrocknete Gewebe genau gewogen.

Abkürzungen

2,4 - D	2,4 - Dichlorphenoxyessigsäure
IAA (3-IAA)	Indolyl - 3 - essigsäure
NAA (1-NAA)	1 - Naphthylessigsäure
TG	Trockengewicht

Statistik

Die Berechnung der Standardabweichung des Mittelwerts erfolgte nach der Formel:

$$S = \frac{1}{\sqrt{n}} \cdot \sqrt{\frac{\text{Summe } (x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

ERGEBNISSE:

Tabelle I zeigt das Ergebnis der Untersuchung aller Pflanzen, aufgeschlüsselt nach Chargen-Nummern, Gesamtalkaloidgehalt (Serpentin und Raubasin) und Anzahl des untersuchten Pflanzenmaterials. Nicht mit einbezogen ist darin die Nummer 257, da sie mit der Ernte nach erst 2 3/4 Jahren nicht mit den übrigen Chargen verglichen werden kann.

Pflanzen-Nr.	% Serpentin und Raubasin					
	0,1-0,3	0,5	0,7	0,8	0,9	1,0
322 .	13	77	32	16	10	5
361 ..	4	8	2	0	0	0
362 ..	85	84	4	1	0	0
367 ..	174	43	1	0	0	0
368 ...	64	5	0	0	0	0
369 ...	47	8	0	0	0	0
370 ...	36	67	2	2	0	0

. Moçambique

.. Madagaskar

... Brasilien

Tabelle 1: Ergebnis des Wurzelscreenings

Die Chargen-Nummer 322 liefert vor den Nummern 362 und 370 die meisten Pflanzen mit hohem Alkaloidgehalt.

Erwähnt seien noch die entsprechenden Aussaatdaten und Gewächshausbezeichnungen:

	Aussaatdatum	Bezeichnung
257	21. April 1973	P 73
322	18. April 1974	P 74
361	15. Oktober 1974	P 72
362	15. Oktober 1974	P 73 Restaussaat
367	3. Dezember 1974	VM 11/74
368	3. Dezember 1974	VB 74/1
369	3. Dezember 1974	VB 74/2
370	3. Dezember 1974	VB 74/3

Im Histogramm (Abbildung 1) läßt sich das Ergebnis des Wurzelscreenings, ebenfalls ohne Berücksichtigung der Chargen-Nummer 257 wie folgt darstellen:

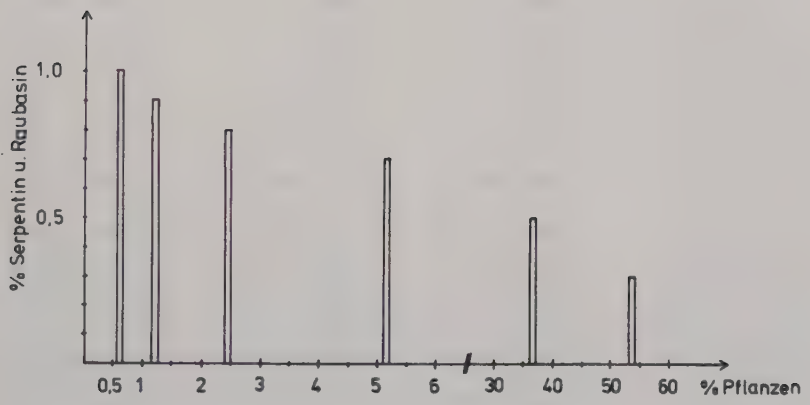


Abbildung 1: Ergebnis des Wurzelscreenings

Während 54 % der untersuchten Pflanzen einen Alkaloidgehalt von Serpentin und Raubasin von 0,3 % und weniger aufweisen, zeigen ungefähr 4 % interessante Alkaloidgehalte zwischen 0,8 % und 1,0 %.

Tabelle 2 zeigt das Ergebnis des Wurzelscreenings von Catharanthus roseus (L.) G. Don, wobei nur die Pflanzen berücksichtigt sind, die einen Gesamtalkaloidgehalt (Serpentin und Raubasin) von 0,69 % bis 1,74 % aufweisen, oder als Ausgangspflanzen für Gewebe mit mittlerem und niedrigem Alkaloidgehalt dienen. Die Tabelle ist angeordnet nach fallendem Serpentingehalt.

Tabelle 2

Pflanzen-Nr.	% Serpentin	% Raubasin	% Gesamt
257-12	1,085	0,660	1,745
257-10	1,061	0.378	1,439
257-13	0,939	0,529	1,468
257- 8	0,908	0,190	1,098
257-20	0,821	0,310	1,131
257-21	0,751	0,417	1,168
257-14	0,708	0,157	0,865
257-22	0,656	0,233	0,889
257-15	0,654	0,120	0,774
257-17	0,637	0,216	0,853
257-11	0,625	0,121	0,746
322-81	0,624	0,303	0,927
257- 5	0,595	0,262	0,857
257-16	0,592	0,505	1,097
322-56	0,570	0,345	0,915
322-74	0,566	0,514	1,080
322-82	0,563	0,429	0,992
322-122	0,561	0,564	1,125

(Tabelle 2)

Pflanzen-Nr.	% Serpentin	% Raubasin	% Gesamt
322-22	0,536	0,218	0,754
322-35	0,534	0,335	0,869
322-89	0,528	0,296	0,824
257-18	0,528	0,305	0,833
367-21	0,521	0,248	0,769
257- 4	0,518	0,198	0,716
322- 2	0,515	0,264	0,779
362-71	0,505	0,161	0,666
322-80	0,503	0,301	0,804
362-72	0,500	0,097	0,597
370-41	0,496	0,368	0,864
322-86	0,496	0,440	0,936
322-44	0,496	0,486	0,982
322-27	0,483	0,481	0,964
322-18	0,479	0,220	0,699
322-12	0,477	0,315	0,792
322- 36	0,476	0,273	0,749
322- 87	0,471	0,582	1,053
361- 9	0,462	0,297	0,759
322- 19	0,457	0,339	0,796
322-105	0,456	0,237	0,693
322- 65	0,455	0,464	0,919
362- 54	0,455	0,251	0,706
322-108	0,449	0,336	0,785
322- 20	0,448	0,342	0,790

(Tabelle 2)

Pflanzen-Nr.	% Serpentin	% Raubasin	% Gesamt
322-130	0,443	0,294	0,737
322- 61	0,438	0,264	0,702
322- 55	0,435	0,471	0,906
322- 8	0,435	0,255	0,690
361- 5	0,434	0,256	0,690
322- 91	0,432	0,496	0,928
322-115	0,429	0,570	0,999
322-102	0,428	0,322	0,750
322- 28	0,419	0,306	0,725
362-119	0,417	0,280	0,697
370- 15	0,416	0,400	0,816
322-113	0,413	0,410	0,823
322-103	0,407	0,399	0,806
322- 70	0,405	0,292	0,697
322- 71	0,403	0,513	0,916
322- 47	0,400	0,466	0,866
322-112	0,400	0,353	0,753
322- 23	0,396	0,416	0,812
322- 79	0,395	0,512	0,907
322- 63	0,393	0,479	0,872
257- 6	0,393	0,281	0,674
322- 75	0,378	0,378	0,756
322- 62	0,370	0,370	0,740
322-106	0,358	0,454	0,812
322-148	0,355	0,363	0,718

(Tabelle 2)

Pflanzen-Nr.	% Serpentin	% Raubasin	% Gesamt
362-165	0,355	0,446	0,801
322- 43	0,354	0,513	0,867
361- 10	0,349	0,158	0,507
322-144	0,343	0,378	0,721
322-116	0,339	0,472	0,811
322- 96	0,323	0,394	0,717
362- 5	0,322	0,176	0,498
322- 97	0,321	0,411	0,732
322-114	0,312	0,391	0,703
322-149	0,294	0,438	0,732
322- 54	0,291	0,550	0,741
322- 50	0,285	0,435	0,720
322-140	0,280	0,420	0,700
322-131	0,275	0,214	0,489
322-111	0,259	0,509	0,768
370- 31	0,236	0,529	0,765
370- 5	0,229	0,258	0,487
368- 24	0,188	0,229	0,417
362-164	0,165	0,548	0,713
369- 16	0,137	0,092	0,229
368- 46	0,123	0,061	0,184
368- 2	0,099	0,073	0,172
368- 4	0,085	0,095	0,180
369- 43	0,061	0,093	0,154

Man kann erkennen, daß die Chargen-Nummer 257 den höchsten Anteil an Pflanzen mit hohem Alkaloidgehalt stellt. Da offensichtlich der Alkaloidgehalt in den Wurzeln mit zunehmendem Alter der Pflanzen ansteigt, denn die Nummer 257 wurde erst 2 3/4 Jahre nach der Aussaat geerntet, wurden daraufhin von einigen Pflanzen die bei der ersten Ernte ein Alter von knapp 1 Jahr hatten, weitere 2 Jahre später Wurzeln abgenommen. Ernte, Gefriertrocknung, Zerkleinerung und Extraktion erfolgten wie bei der ersten Ernte.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3

Pflanzen-Nr.	% Serpentin		% Raubasin		% Gesamt	
	I	II	I	II	I	II
257- 12	1,085	0,905	0,660	0,548	1,745	1,453
257- 13	0,896	0,361	0,698	0,343	1,594	0,704
257- 10	0,883	0,408	0,299	0,419	1,182	0,827
257- 8	0,765	0,688	0,216	0,360	0,981	1,048
257- 20	0,758	0,584	0,411	0,418	1,169	1,002
257- 21	0,732	0,646	0,600	0,528	1,323	1,174
257- 16	0,574	0,783	0,625	0,700	1,199	1,483
322- 74	0,566	0,578	0,514	0,574	1,080	1,152
322- 82	0,563	0,758	0,429	0,543	0,992	1,301
322-122	0,561	1,512	0,564	0,594	1,125	2,106
322- 87	0,471	0,827	0,582	0,722	1,053	1,549

(Tabelle 3)

Pflanzen-Nr.	% Serpentin		% Raubasin		% Gesamt	
	I	II	I	II	I	II
322-115	0,429	0,698	0,570	0,481	0,999	1,179
361- 10	0,349	0,993	0,158	0,422	0,507	1,415
362- 5	0,322	0,988	0,176	0,798	0,498	1,786
322-131	0,275	0,376	0,214	0,522	0,489	0,898
370- 5	0,229	0,304	0,258	0,234	0,487	0,538
368- 24	0,188	0,407	0,229	0,348	0,417	0,755
369- 16	0,137	1,202	0,092	0,649	0,229	1,851
368- 46	0,123	0,630	0,061	0,948	0,184	1,578
368- 2	0,099	0,628	0,073	0,212	0,172	0,840
368- 4	0,085	0,447	0,095	0,844	0,180	1,291
369- 43	0,061	0,360	0,093	0,756	0,154	1,116

I: 1. Ernte nach knapp 1 Jahr

II: 2. Ernte weitere 2 Jahre später

Anhand dieser Beispiele läßt sich eine - teilweise starke - Zunahme der Alkaloidgehalte zeigen, jedoch ist auffallend, daß Pflanzen, die schon bei der ersten Ernte einen recht hohen Alkaloidgehalt aufwiesen und knapp 3 Jahre alt waren zum überwiegenden Teil diesen nicht mehr steigern. Je geringer jedoch die Serpentin- bzw. Raubasinkonzentration bei der ersten Ernte war, wobei die Pflanzen knapp oder ungefähr 1 Jahr alt waren, desto regelmäßiger steigen die Alkaloidgehalte bei der zweiten Ernte an, die im

Einzelfall (369- 16) das Sechsfache oder (322-122) über 2 % erreichen können.

Die entsprechenden Altersangaben, bezogen auf die erste Ernte, liegen bei 27, 29 und 35 Monaten, eine Charge war bei der zweiten Ernte knapp 4 Jahre alt.

Daraus läßt sich folgern, daß die untersuchten Pflanzen während der ersten 2 1/2 Jahre nach der Aussaat zunehmend in ihren Wurzeln Alkaloide bilden, daß also das Alter der Wurzeln zum Zeitpunkt der Ernte von Bedeutung für die zu erreichenden Alkaloidwerte ist.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Wurzelscreenings

10 % des untersuchten Pflanzenmaterials weisen Serpentin- und Raubasinwerte von 0,7 % bis 1,7 % auf.

Das Alter der Catharanthus roseus Wurzeln spielt für den Alkaloidgehalt eine wesentliche Rolle. In den ersten 2 1/2 Jahren nach der Aussaat bilden die Wurzeln vermehrt Serpentin und Raubasin. Später tritt keine wesentliche Steigerung der erreichten Werte mehr ein.

Inwieweit und ob sich geographische Faktoren auf die Alkaloidbildung auswirken kann nicht festgestellt werden.

Nach Abschluß des Screenings der Pflanzen wurden von ausgewählten Pflanzen Spross- und Wurzelcalluskulturen angelegt. Es sollte die Hypothese geprüft werden, ob Pflanzen mit hohem Ausgangsgehalt auch von vornherein Calluskulturen mit hohem Alkaloidbildungsvermögen erwarten lassen. Als Kriterium für die Anlage der Gewebekulturen galt die Einteilung in solche Pflanzen, die

a) einen hohen Serpentin- und Raubasingehalt

(322- 74), 5; (322- 82), 6; (322- 87), 12; (322-115), 13;
(322-122), 7; (257- 12), 1; (257- 13), 2;

b) einen Serpentingehalt größer 0,5 % und kleineren Raubasingehalt

(322- 2), 10; (322- 35), 8; (322- 56), 4; (322- 81), 3;
(322- 89), 9; (322- 80), 11;

c) einen Raubasingehalt größer 0,5 % und kleineren Serpentingehalt

(322- 43), 16; (322- 71), 14; (322- 79), 15; (322-111), 20;
(370- 31), 21;

d) einen mittleren Alkaloidgehalt

(322-131), 19; (361- 10), 17; (362- 5), 18; (368-24), 23;
(370- 5), 22;

und

e) einen niedrigen Gehalt an Serpentin und Raubasin aufwiesen

(368-2), 26; (368- 4), 27; (368- 46), 25; (369- 16), 24;
(369- 43), 28.

In Klammern angegeben sind die Pflanzen-Nummern vom Screening der Wurzeln, die Zahlen dahinter gelten für die entsprechenden Callus-kulturen.

Eine Übersicht der 28 ausgewählten Pflanzen, von denen Gewebekulturen angelegt wurden, gibt Abbildung 2.
Angegeben ist der Serpentinwert und der Raubasinwert in % Alkaloid/ Trockengewicht jeder einzelnen Pflanze, von links nach rechts (1 bis 28) angeordnet nach fallendem Serpentingehalt.
Die mit einem Sternchen bezeichneten Pflanzen enthalten mehr als 0,5 % Raubasin.

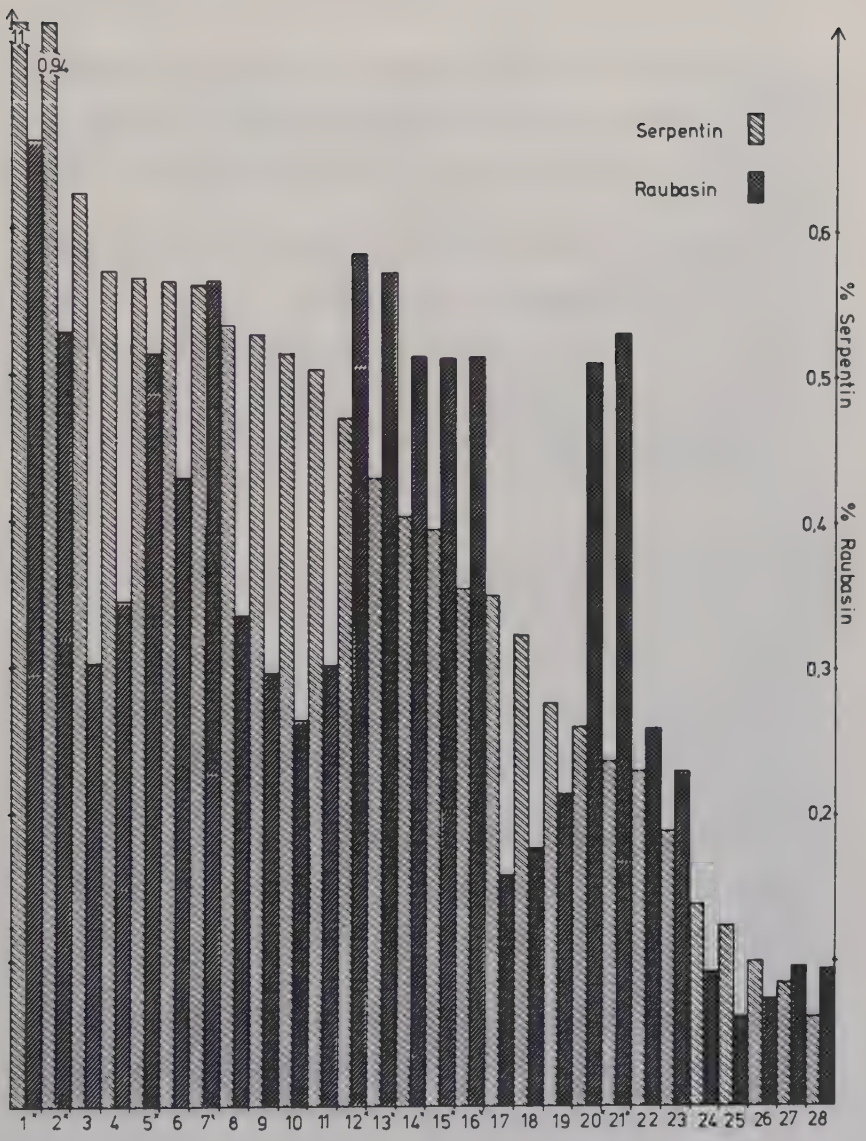

Serpentin
Raubasin
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
% Serpentin
% Raubasin
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Abbildung 2

Das Screening ergab, daß das untersuchte Pflanzenmaterial großen Schwankungen betreffend der Serpentin- und Raubasinkonzentration in den Wurzeln unterlegen ist.
Die folgenden Versuche sollten zeigen, ob es möglich ist, anhand von Gewebekulturen, die von Pflanzen mit unterschiedlich hohen Alkaloidkonzentrationen angelegt wurden, Rückschlüsse auf das Alkaloidbildungsvermögen Pflanze/Gewebe zuzulassen.
Bei einigen Untersuchungen wurde dabei noch in Spross- und Wurzelgewebe ein und derselben Pflanze unterteilt.
Um diese Frage zu klären wurden die Gewebe unter dem Einfluß verschiedener Medien, unterschiedlicher Versuchsdauer und der Einwirkung von Licht und Dunkel auf ihre Serpentinbildung hin untersucht.

Zunächst wurden alle 28 Sprosscalli über mehrere Passagen - 1 Passage dauerte 4 Wochen - auf ihre Serpentinproduktion hin beobachtet. Abbildung 3 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung, von links nach rechts angeordnet nach fallendem Serpentingehalt in der Pflanze. Von den Calli ist der Mittelwert aller Messungen angegeben.

Deutlich ist zu erkennen, daß die Pflanze mit dem höchsten Serpentingehalt auch im Gewebe am meisten Serpentin bildet (Nr. 1), daß aber auch Pflanzen mit wesentlich weniger Serpentin in der Wurzel relativ mehr Serpentin im Gewebe bilden (Nr. 11, 17, 18, 19, 21, 26, 28), als Pflanzen mit höherem Serpentingehalt (Nr. 4 - 10). Auch zeigt die Nr. 28 einen viel höheren Alkaloidgehalt als es ihrer Anordnung nach zu erwarten gewesen wäre.

Pflanze
Callus
% Serpentin
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
1,1
0,9
0,8
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Abbildung 3

Dieses Ergebnis läßt die Aussage zu, daß die Alkaloidbildung in der Pflanze nicht zwangsläufig mit der des davon angelegten Sprossgewebes korrelieren muß.

Um diese erste Feststellung zu erhärten, gleichzeitig aber auch eine Steigerung der Serpentinwerte zu erreichen, wurden die Gewebe bei den folgenden Versuchen auf die drei Medien G_{20}, A_R und G_{48} gegeben.

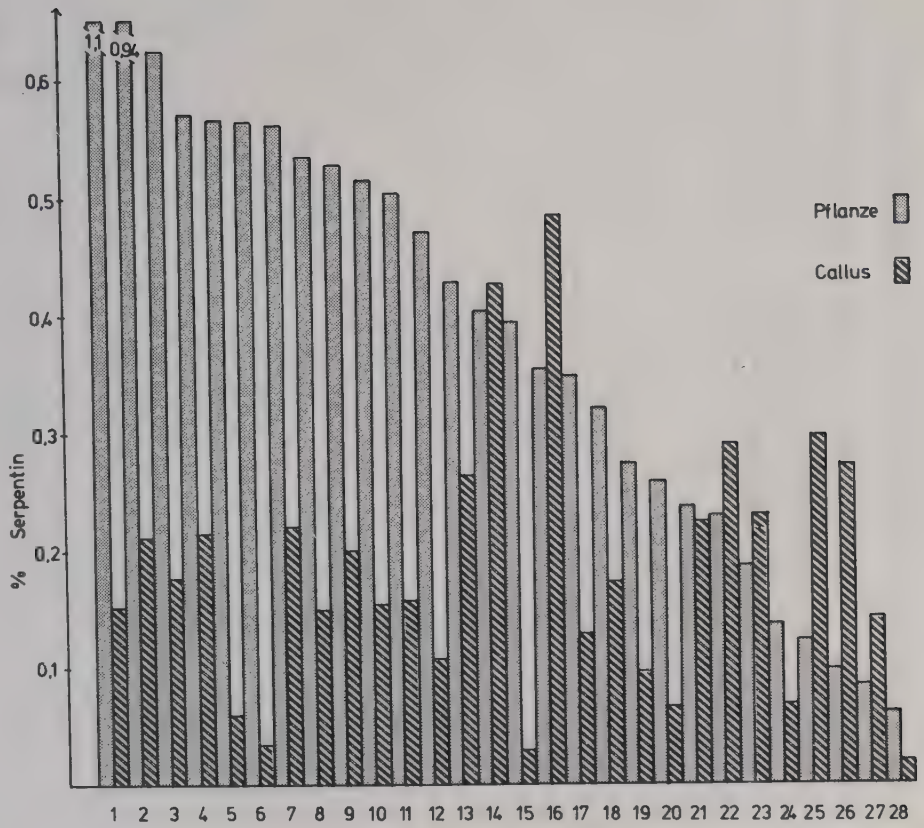
Diese Medien hatten sich in vorangegangenen Untersuchungen als die Serpentinausbeute günstig beeinflussend herausgestellt. Die Ernte erfolgte nach 5 und 7 Wochen.

Die Anordnung der Gewebe-Nummern der folgenden Histogramme ist wiederum nach fallendem Serpentingehalt in der Pflanze.

Medium G_{20} , Ernte nach 5 Wochen, Sprossgewebe: Abbildung 4

Auffallend sind die hohen Werte der Gewebe Nr. 14 und 16 (0,43, 0,48 % Serpentin/TG), die, ebenso wie die Nr. 22, 23, 25, 26 und 27 sogar die Serpentinkonzentration der entsprechenden Ausgangspflanzen übertreffen. Auch liegen die letztgenannten mit ihrem Alkaloidgehalt wiederum über dem solcher Pflanzen, die in der Wurzel mehr Serpentin enthalten (Nr. 1 - 12).

Abbildung 4


1,1
0,9
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
% Serpentin
Pflanze
Callus
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Medium A_R, Ernte nach 5 Wochen, Sprossgewebe: Abbildung 5

Anders verhalten sich dagegen die Gewebe auf dem Medium A_R nach einer Versuchsdauer von 5 Wochen.
Während hier die Nr. 1 mit dem höchsten Pflanzengehalt bis über 0,5 % Serpentin bildet, liegen die Werte der übrigen Sprosscalli durchschnittlich zwischen 0,1 % und 0,25 %. Auch hier ist keine Regelmäßigkeit der Serpentinproduktion der Sprosscalli zu beobachten, denn Pflanzen mit mittlerem und niedrigem Alkaloidgehalt bilden in den Calli relativ mehr Serpentin als es ihren Ausgangspflanzen nach zu erwarten gewesen wäre.

Pflanze
Callus
% Serpentin
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
1,1
0,9
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Abbildung 5

Medium G_{48} , Ernte nach 5 Wochen, Sprossgewebe: Abbildung 6

Auffallend ist das starke Absinken aller Werte auf dem Medium G_{48} , verglichen mit den Medien G_{20} und A_R nach einer Versuchsdauer- von 5 Wochen. Dennoch bildet das Gewebe Nr. 1 auch hier am meisten Serpentin jedoch liegen die Gewebe Nr. 11 und 17 mit ihrer Serpentinkonzentration nicht wesentlich tiefer. Wie schon bei den letzten Versuchen lassen sich keine Voraussagen darüber machen, ob Pflanzen mit höherem Serpentingehalt auch im Gewebe mehr Serpentin produzieren.

Abbildung 9

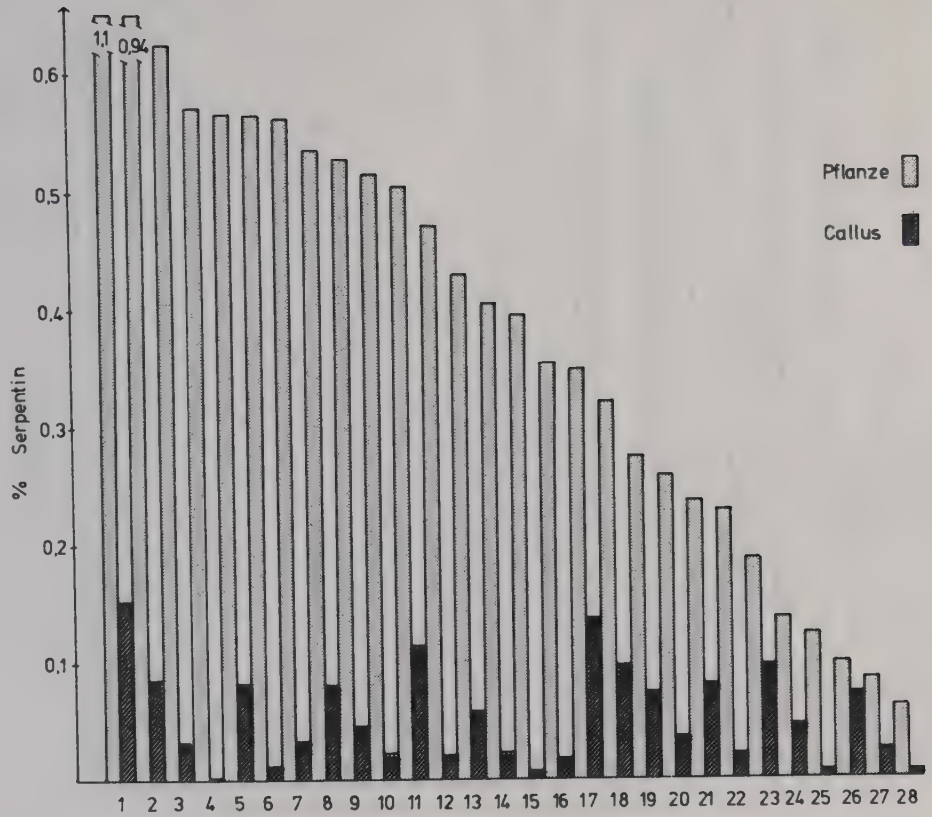

1,1
0,9
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
% Serpentin
Pflanze
Callus
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Abbildung 7 vergleicht die Serpentingehalte der drei Medien G_{20} , A_R und G_{48} untereinander bei der Ernte nach 5 Wochen.

Zusammenfassung der Medieneinflüsse G_{20} , A_R und G_{48} nach 5 Wochen Versuchsdauer :

Während bei nahezu allen Sprosscalli (Ausnahmen sind die Gewebe-Nr. 5, 17, 21) auf dem Medium G_{48} die Serpentinbildung am geringsten ist, zeigt etwas mehr als die Hälfte aller Gewebe auf dem Medium G_{20} einen höheren Alkaloidgehalt als auf dem Medium A_R. Dabei ist zu beobachten, daß Pflanzen mit niedrigem Serpentingehalt auf dem G_{20} -Medium Pflanzen mit höheren Ausgangswerten übertreffen. Andererseits zeigen Pflanzen mit mittlerem Serpentingehalt in der Wurzel auf dem A_R -Medium bessere Werte, als Pflanzen mit hohem oder niedrigem Ausgangsgehalt.

G_{20}
A_R
G_{48}
% Serpentin
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Abbildung 7

Medium G_{20} , Ernte nach 7 Wochen, Sprossgewebe: Abbildung 8

Beim Vergleich des Serpentingehalts im Sprossgewebe nach 7 Wochen Wachstum auf dem G_{20} -Medium mit den entsprechenden Wurzeln zeigt sich, daß Pflanzen mit mittlerem Serpentingehalt in den Calli am meisten Serpentin bilden (Nr. 10, 13, 14). Während auch das Sprossgewebe von Pflanzen mit niedrigem Serpentingehalt (Nr. 21, 22) recht hohe Werte, teilweise mehr als das Doppelte (Nr. 25, 26, 27) verglichen mit der Ausgangspflanze erreicht, bildet das von Pflanzen mit hohen Gehalten (Nr. 1 - 6) durchschnittlich nicht mehr Serpentin.

Pflanze
Callus
% Serpentin
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
1,1
0,94
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Abbildung 8

Medium A_R, Ernte nach 7 Wochen, Sprossgewebe: Abbildung 9

Im Gegensatz zu den vorigen Ausführungen verhalten sich die Gewebe auf dem A_R -Medium nach einer Versuchsdauer von 7 Wochen wie folgt: mit Werten von 0,41 bis 0,49 % Serpentin in den Calli liegen die Pflanzen mit hohen Ausgangsgehalten (Nr. 1, 3) vorn, nur vom Gewebe Nr. 18 übertroffen, das hier 0,5 % Serpentin enthält. Zwar zeigen auch Pflanzen mit hohen Alkaloidgehalten (Nr. 4 - 7), ebenso wie Pflanzen mit mittleren (Nr. 9, 14, 15) und geringeren (Nr. 21, 22, 25, 28) Ausgangsgehalten Serpentinkonzentrationen von 0,05 bis 0,1 %, aber die Abbildung 9 läßt deutlich erkennen, daß die Calli im Durchschnitt hohe Serpentinwerte erreichen.

Pflanze
Callus
Serpentin
%
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
1,1
0,9
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Abbildung 9

Medium G_{48} , Ernte nach 7 Wochen, Sprossgewebe: Abbildung 10

Wie schon bei der Ernte nach 5 Wochen auf demselben Medium beschrieben, sinken auch bei der Ernte nach 7 Wochen verglichen mit den beiden letztgenannten Medien die Serpentinkonzentrationen ab. Bemerkenswert erscheint die Tatsache, daß hier nun Pflanzen mit hohen Ausgangsgehalten (Nr. 1, 5) auch in den Geweben deutlich den relativ höchsten Serpentingehalt aufweisen.

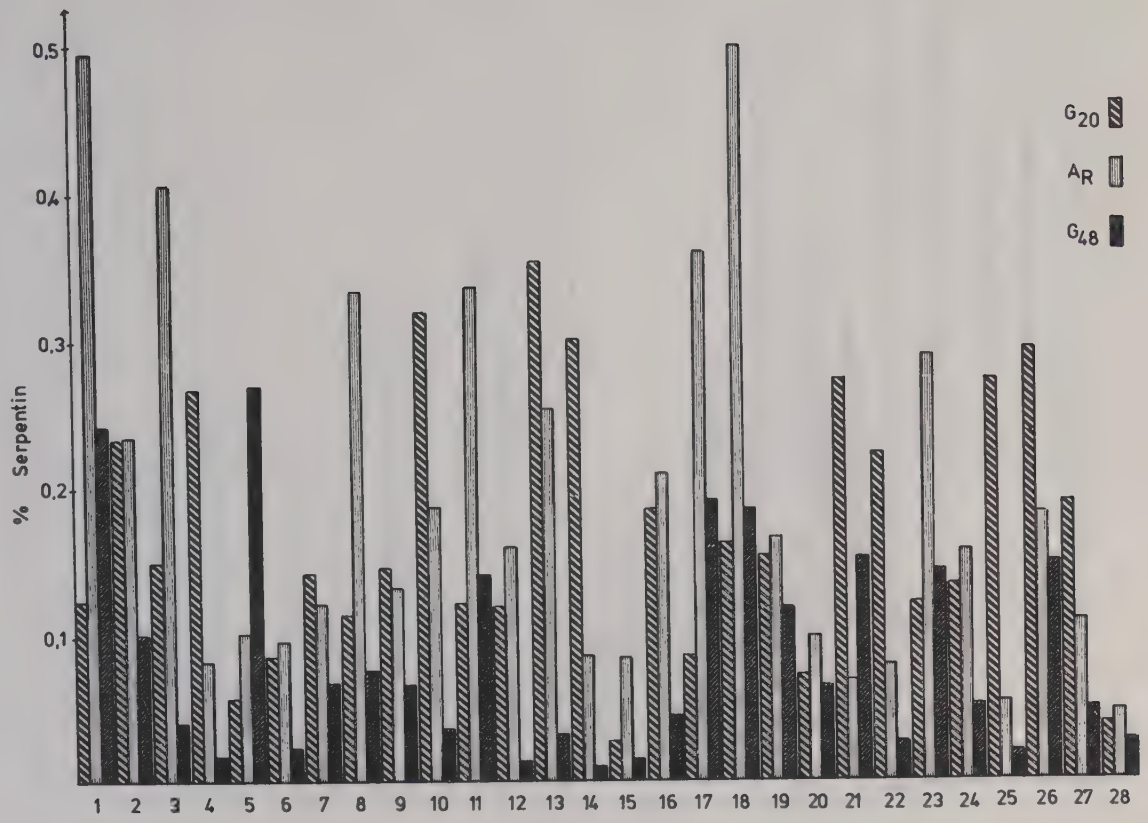
Abbildung 10

Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse auf den Medien G_{20}, A_R und G_{48} nach einer Versuchsdauer von 7 Wochen in der Übersicht.

Zusammenfassung der Medieneinflüsse G_{20}, A_R, G_{48} nach 7 Wochen Versuchsdauer :

Die besten Serpentinwerte werden auf dem A_R -Medium erreicht, was bei Geweben egal, ob von hohen, mittleren oder niedrigen Ausgangspflanzen stammend, übereinstimmend festgestellt werden kann. Auch auf dem Medium G_{20} werden durchschnittlich gute Werte erzielt; bei einigen Beispielen (Nr. 1, 5, 11, 17, 18, 23) werden auf dem Medium G_{48} diese zwar übertroffen, ansonsten zeigt sich auf dem Medium G_{48} jedoch die geringste Serpentinproduktion.

Abbildung 11



Medium G_{20} , Ernte nach 5 und 7 Wochen, Sprossgewebe: Abbildung 12

Bei 15 von 28 aufgeführten Beispielen hat der Serpentingehalt nach 7 Wochen verglichen mit dem von 5 Wochen Versuchsdauer abgenommen. Während im Einzelfall (Nr. 14, 16) bei 5-wöchiger Ernte bis zu knapp 0,5 % Serpentin gebildet werden, halten sich in anderen Fällen Werte die nach 5 oder 7 Wochen erhalten werden in der Serpentinkonzentration die Waage, wobei folgendes festgestellt werden kann:
Gewebe von Pflanzen mit niedrigen Ausgangsgehalten weisen durchschnittlich keineswegs geringere Alkaloidkonzentrationen auf als solche von Pflanzen mit höheren Ausgangsgehalten.

Abbildung 12

Medium A_R , Ernte nach 5 und 7 Wochen, Sprossgewebe: Abbildung 13

Im Gegensatz zum G_{20} -Medium steht das Verhalten auf dem A_R -Medium. Nach 7 Wochen Versuchsdauer wird bei allen Calluskulturen (Ausnahme Nr. 1, 20) ein Anstieg der Serpentingehalte beobachtet. Hier nun ist eine Parallelität der Serpentinproduktion zwischen Pflanze und Gewebe insofern zu registrieren, als Calli von Pflanzen mit hohen Ausgangsgehalten auch relativ mehr und höhere Serpentingehalte aufweisen. Damit können allerdings die Gewebe-Nummern mit weniger hohen Ausgangsgehalten (Nr. 17, 18) verglichen werden.

Abbildung 13

Medium G_{48}, Ernte nach 5 und 7 Wochen, Sprossgewebe: Abbildung 14

Auch anhand dieses Beispiels wirkt sich der Zeitfaktor so aus, daß nach 7 Wochen eine Steigerung der Serpentinproduktion festgestellt werden kann. Das Histogramm läßt wiederum die relativ größeren Werte der Gewebe-Nummern 17, 18, 21, 23 und 26 erkennen.

Zusammenfassung der Einwirkung der Versuchsdauer auf die Alkaloidbildung auf den Medien G_{20}, A_R, G_{48}:

Auf dem Medium G_{20} werden bei etwas mehr als der Hälfte aller Gewebe nach 5 Wochen höhere Serpentinwerte erreicht als nach einer Versuchsdauer von 7 Wochen. Auf den Medien A_R und G_{48} zeigt sich nach 7 Wochen verglichen mit den Werten, die nach 5 Wochen erhalten werden, in fast allen Fällen ein Anstieg der Serpentinproduktion.

Abbildung 14

Da bei den folgenden Versuchen zwischen Alkaloidgehalt in der Pflanze, im Spross- und im Wurzelgewebe verglichen werden sollte wurden 4 Pflanzen mit verschieden hohem Alkaloidgehalt ausgewählt:

Gewebe-Nr.	Pflanzen-Nr.	% Serpentin	% Raubasin	% Gesamt
7	322-122	0,561	0,564	1,125
19	322-131	0,275	0,214	0,489
21	370- 31	0,236	0,529	0,765
27	368- 4	0,085	0,095	0,180

Die Histogramme enthalten zum direkten Vergleich den Serpentingehalt in der Pflanze zusätzlich zu den Ergebnissen, die die Gewebeuntersuchung liefert.

Einfluss der Medien G_{20}, A_R und F_1 auf die Serpentinbildung im Sprossgewebe: Abbildung 15

Auf dem Medium G_{20} bilden die Gewebe Nr. 21 und 27 entsprechend ihren Ausgangspflanzen am wenigsten Serpentin, wobei das der Pflanze mit geringstem Ausgangsgehalt noch mehr Serpentin produziert als Gewebe-Nr. 21, jedoch bildet Gewebe-Nr. 19, dessen Pflanze den zweithöchsten Alkaloidgehalt aufweist mehr Serpentin als Gewebe Nr. 7.

Ein völlig anderes Bild zeigt dagegen das Verhalten der Gewebe auf dem Medium A_R . Sowohl Nr. 7 und 19 verhalten sich wie von den Pflanzengehalten her zu erwarten ist, nicht dagegen die Nr. 21 und 27, die mit ihrem Serpentingehalt die beiden Gewebe 7 und 19 erreichen, bzw. übertreffen. Optisch sehr ähnlich, jedoch im Serpentingehalt niedriger verhalten sich die Gewebe auf dem Medium F_1, wobei hier aber die Differenz zwischen Gewebe 7 und 19 größer ist. Auch hier bilden die Gewebe der Pflanzen mit geringerem Alkaloidgehalt etwas mehr Serpentin als gemäß ihrer Ausgangspflanzen zu erwarten gewesen wäre. Vergleicht man die Alkaloidproduktion dieser 4 Gewebe auf den drei Medien, so werden auf dem A_R -Medium die höchsten Serpentinwerte erreicht. (Vgl. Abbildung 11).

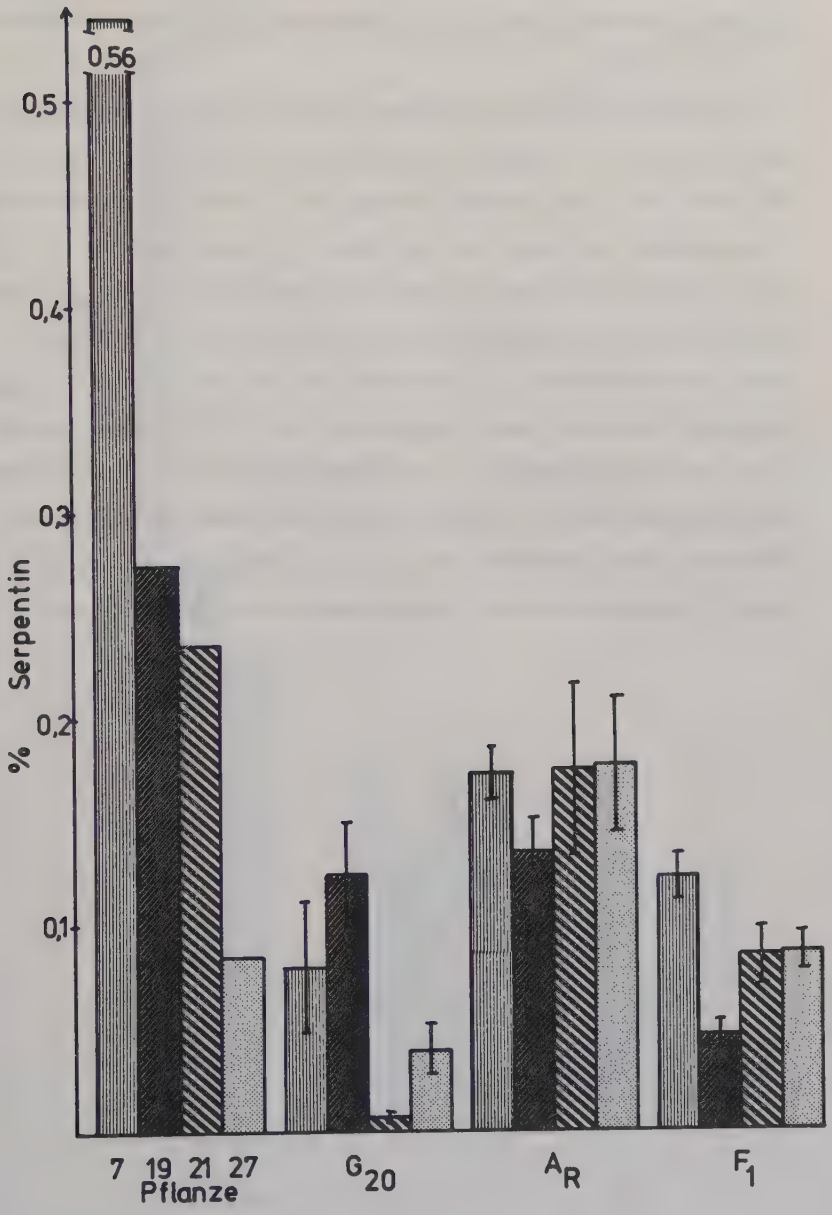


Abbildung 15

Vergleich zwischen Spross- und Wurzelgewebe, Medium A_R : Abbildung 16

Beim Vergleich des Serpentingehaltes zwischen Stengel- und Wurzelgewebe zeigt Abb. 16, daß im Wurzelgewebe der Alkaloidgehalt mit Werten von 0,085 % bis 0,137 % etwas niedriger liegt, als der des entsprechenden Sprossgewebes, das hier, auf dem Medium A_R einen Gehalt von 0,136 % bis 0,178 % Serpentin aufweist. Da im Wurzelgewebe Serpentin gefunden wurde, wird die genetische Information der Alkaloidbildung im Wurzelcallusgewebe beibehalten. Zu beobachten ist, daß Spross- und Wurzelgewebe der Pflanze mit hohem Alkaloidgehalt (Nr. 7) bei diesem Versuch nicht mehr Serpentin bildet als die Gewebe der Pflanzen mit niedrigerem Serpentingehalt (Nr. 21, 27). Auch bildet das Gewebe Nr. 27, dessen Pflanze in dieser Aufstellung den niedrigsten Serpentingehalt aufweist sowohl im Spross- als auch im Wurzelgewebe relativ mehr Serpentin.

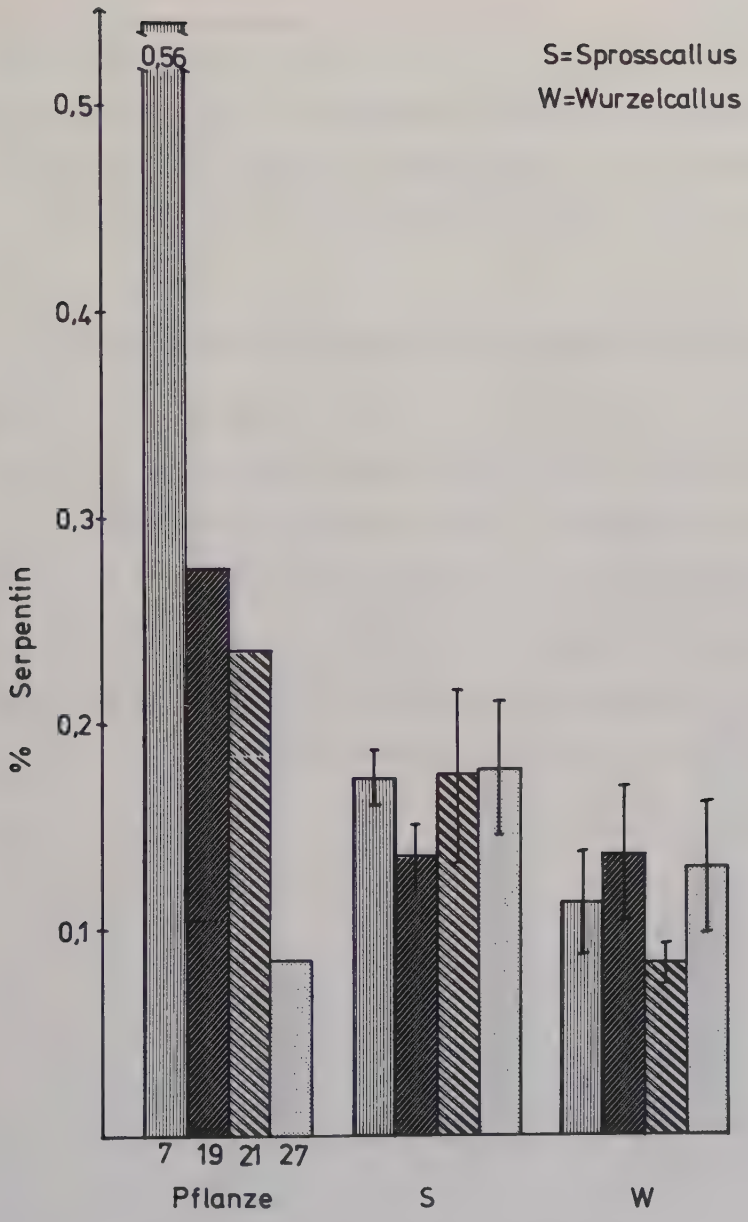


Abbildung 16

Die Versuche, die mit den Sprossgeweben durchgeführt wurden, wurden mit Wurzelgeweben der 4 oben genannten Pflanzen wiederholt. Da die Wurzel als der Ort mit dem höchsten Alkaloidgehalt gilt (32, 33, 34, 35, 36), sollte beobachtet werden, ob das Wurzelgewebe eventuell mehr Serpentin produziert als die Sprosscalluskulturen derselben Pflanze, (28, 29, 30).

Medium G_{20}, Ernte nach 5 und 7 Wochen, Wurzelgewebe: Abbildung 17

Bei der Ernte nach 5 Wochen zeigen die Wurzelcalli Nr. 7, 19 und 21 entsprechend ihren Ausgangspflanzen fallende Serpentinwerte, was bei der Ernte nach 7 Wochen nur für die ersten beiden Gewebe zutrifft.
Außerdem sind bei diesen Geweben die Serpentinwerte nach einer Versuchsdauer von 7 Wochen gesunken. Das entspricht dem Verhalten einiger Sprossgewebe (Vgl. Abbildung 12). Dagegen zeigt das Wurzelgewebe der Pflanze mit dem niedrigsten Gehalt den höchsten Serpentinwert, der nach 7 Wochen über dem des nach 5 Wochen erhaltenen liegt.

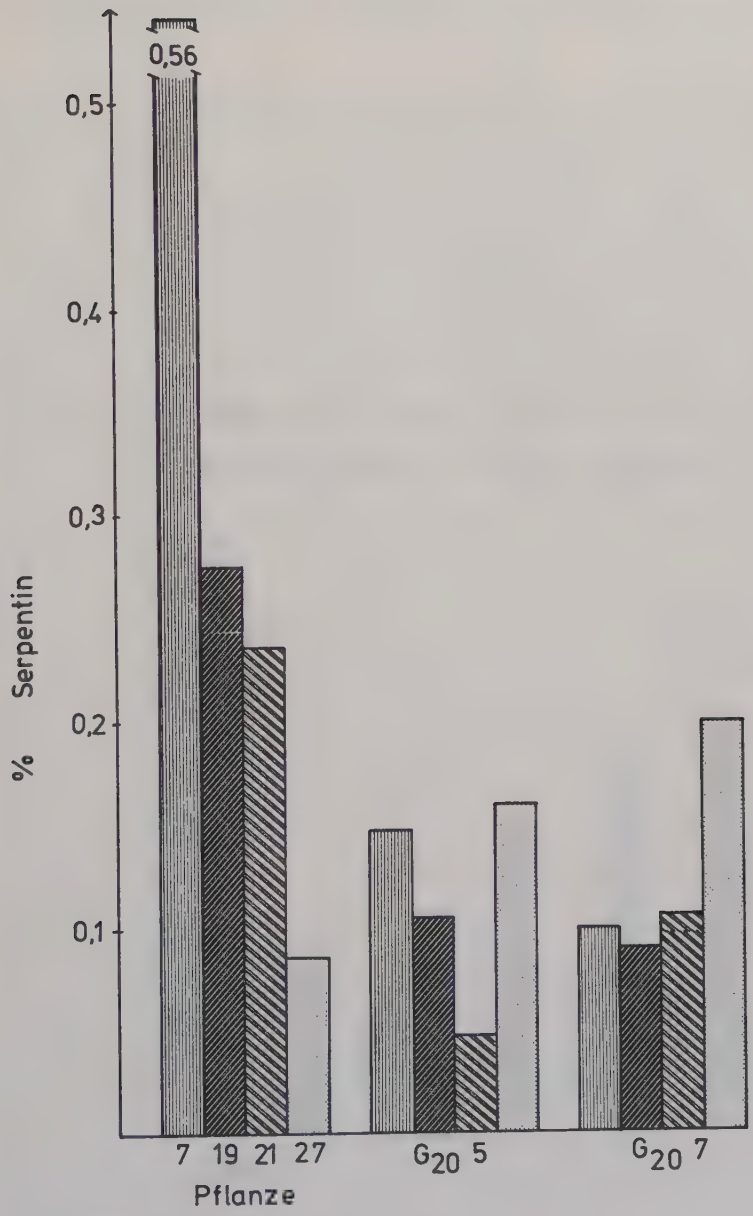


Abbildung 17

Medium A_R, Ernte nach 5 und 7 Wochen, Wurzelgewebe: Abbildung 18

Abbildung 18 läßt erkennen, daß wiederum das Gewebe Nr. 27 am meisten Serpentin bildet, wobei der Gehalt von 0, 11 % nach 5 Wochen auf 0,22 % nach 7 Wochen ansteigt. Auch in den Fällen 19 und 21 tritt nach 7 Wochen Versuchsdauer eine Verdoppelung der Alkaloidgehalte (Vgl. Abb. 13) ein; jedoch können auch hier in bezug auf Pflanzengehalt / Gewebegehalt keine Parallelen gezogen werden. Es ist bemerkenswert, daß auf dem A_R-Medium nach 7 Wochen nur bei zwei Geweben höhere Serpentinwerte erhalten werden. Dies steht im Gegensatz zum Verhalten der Sprosskulturen (Vgl. Abbildung 9), die hier hohe Serpentingehalte erreichen.

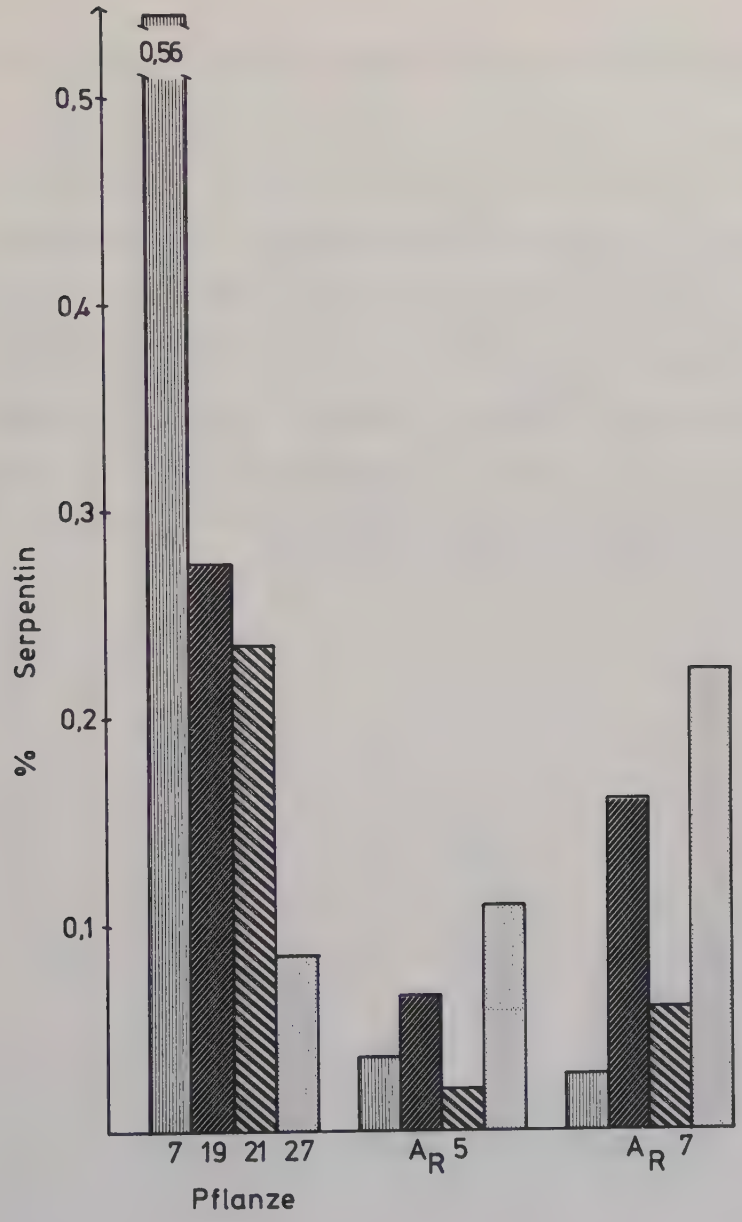


Abbildung 18

Medium G_{48}, Ernte nach 5 und 7 Wochen, Wurzelgewebe: Abbildung 19

Auffallend ist die relativ höchste Serpentinkonzentration von Gewebe Nr. 27, die allerdings schon nach 5 Wochen Wachstum ihr Maximum erreicht hat. Die restlichen drei Gewebe lassen nach einer Versuchsdauer von 7 Wochen ein Ansteigen der Serpentinwerte gegenüber einer Dauer von 5 Wochen erkennen (Vgl. Abbildung 14). Gewebe von Pflanzen mit mittlerem und niedrigem Alkaloidgehalt bilden mehr Serpentin als das von der Pflanze mit hohem Gehalt. Die nach 5 und 7 Wochen erhaltenen Werte sind geringer als die auf dem G_{20} -Medium, und teilweise geringer als die auf dem A_R -Medium erhaltenen. Optisch ist der Eindruck der Serpentinbildung auf dem Medium A_R und G_{48} nach 5 Wochen völlig gleich.

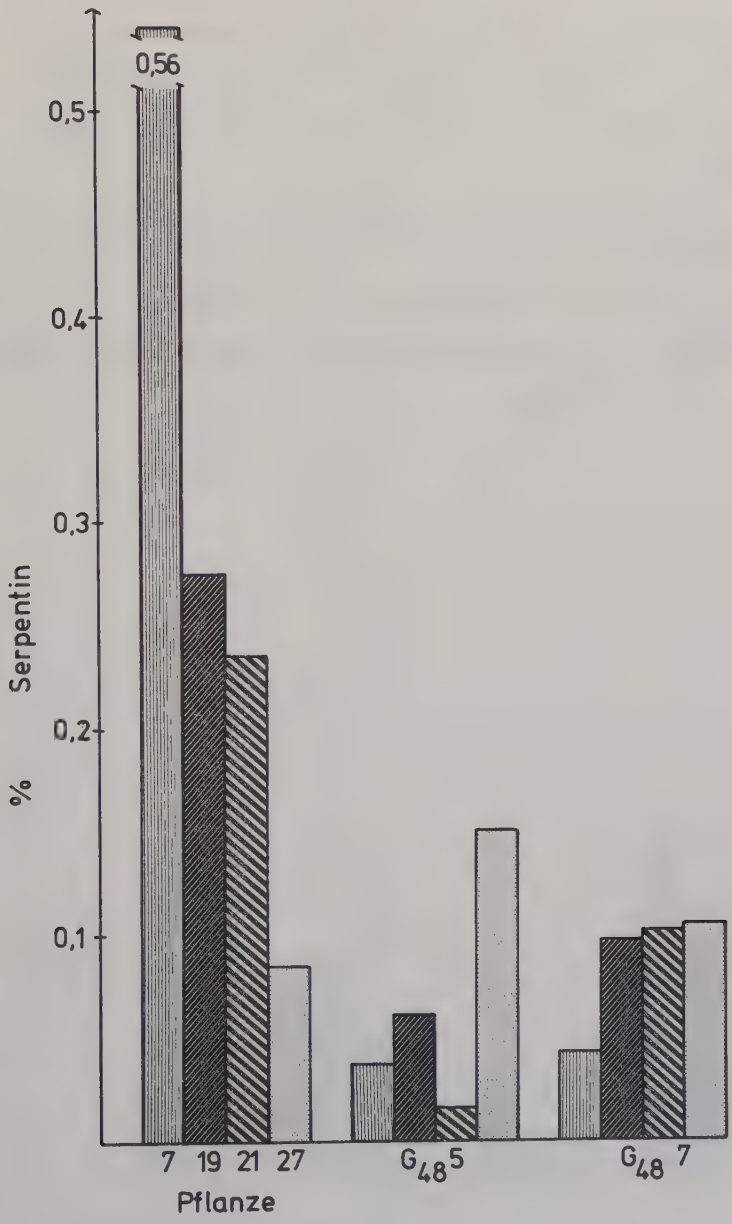


Abbildung 19

In Anlehnung an die Untersuchungen der Sprosscalluskulturen soll Abbildung 20 eine entsprechende Übersicht der Wurzelcalluskulturen auf den 3 Medien G_{20}, A_R, G_{48} nach einer Zeit von 5 Wochen liefern.

Bei allen 4 Beispielen werden auf dem G_{20} -Medium die höchsten Serpentinwerte erhalten. Die Gewebe Nr. 7, 19 und 21 zeigen keine großen Unterschiede betreffend der Serpentinbildung auf den Medien A_R und G_{48}, nur das Gewebe Nr. 26 erreicht auf dem Medium G_{48} nahezu denselben Wert wie auf dem G_{20} -Medium.

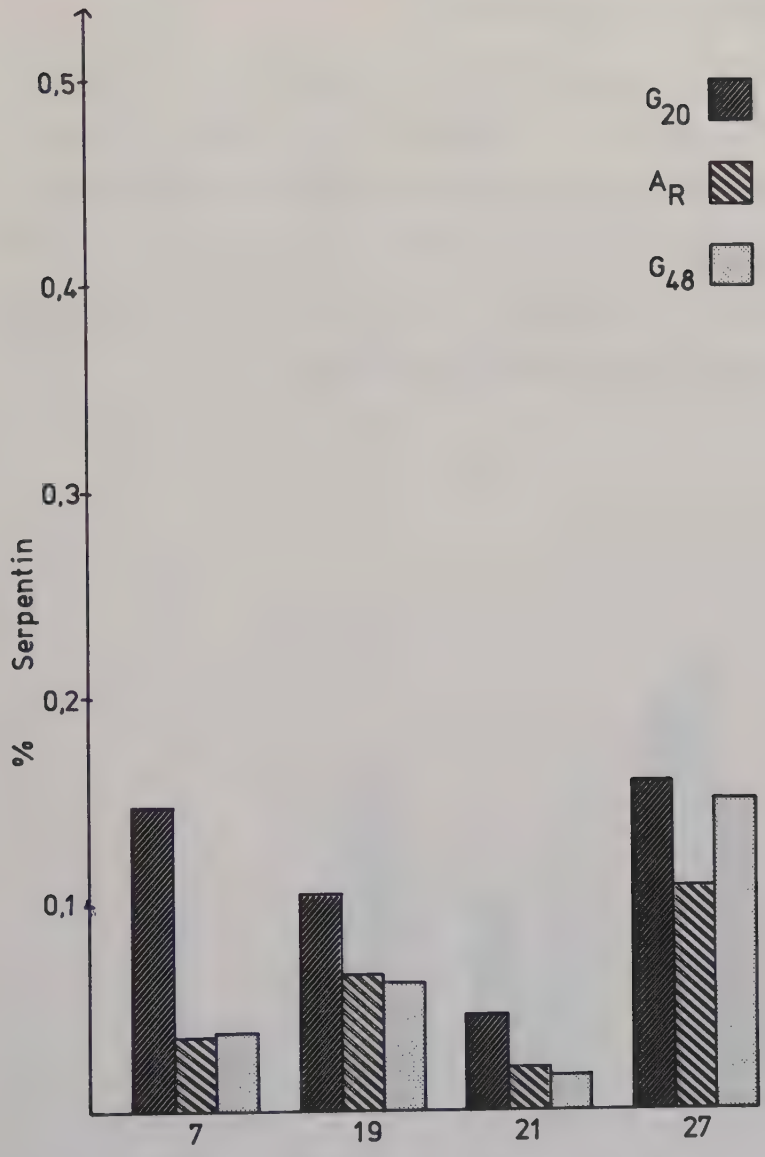


Abbildung 20

Dieselbe Übersicht bezogen auf eine Ernte nach 7 Wochen -Abbildung 21- läßt sich wie folgt interpretieren:

Gewebe Nr. 7 und 21 erreichen auf dem Medium G_{20} gute Werte, die bei den Geweben 19 und 21 mit denen auf dem G_{48} -Medium zu vergleichen sind. Gewebe 7 und 27 zeigen auf letztgenanntem ein Absinken. Recht hohe Werte werden von den Geweben 19 und 27 auf dem A_R -Medium erzielt. Insgesamt betrachtet liefern die Wurzelgewebe von Pflanzen mit mittlerem und niedrigerem Ausgangsgehalt höhere Werte als das von der Pflanze mit dem hier höchsten Ausgangsgehalt.

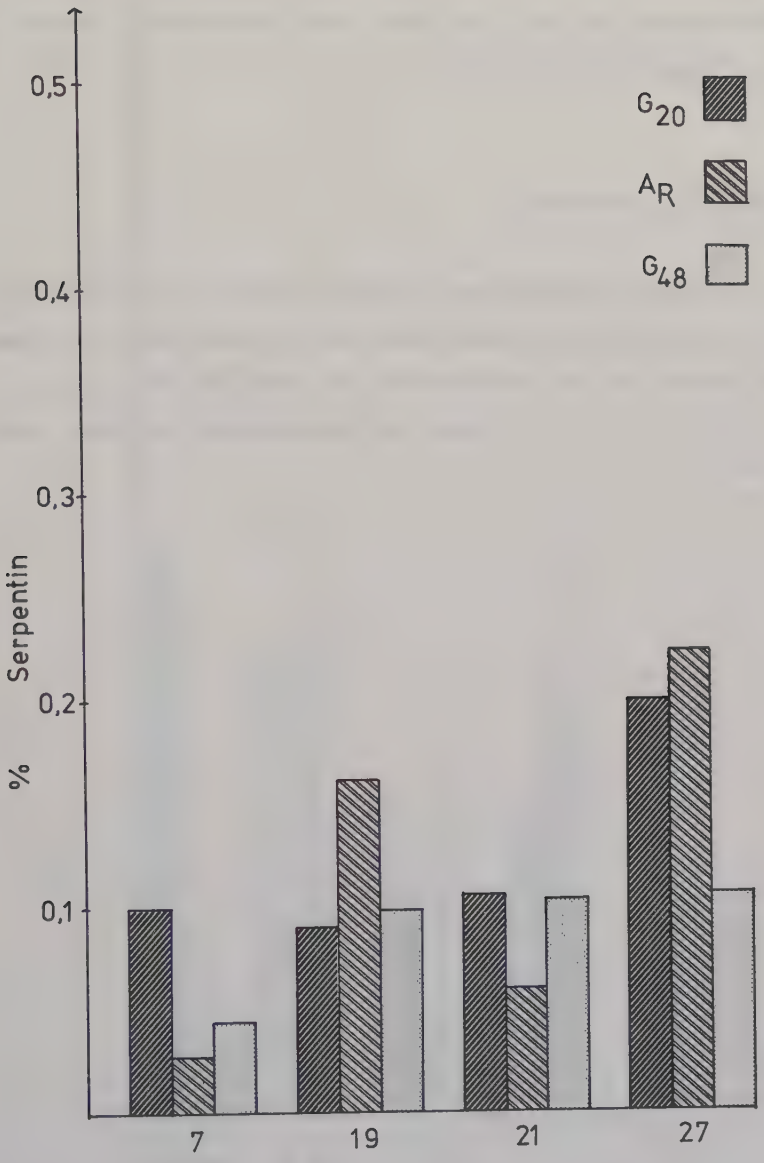


Abbildung 21

Den Vergleich vom Serpentingehalt der Pflanze mit dem des Spross- und Wurzelgewebes bei einer Ernte nach 5 und 7 Wochen auf den Medien G_{20}, A_R und G_{48} bieten die folgenden 3 Histogramme:

Medium G_{20}: Abbildung 22

Die Wurzelgewebe bilden unter denselben Bedingungen weniger Serpentin als die entsprechenden Sprossgewebe; eine Ausnahme macht davon jedoch das Gewebe (Nr. 27) der Pflanze mit dem niedrigsten Ausgangsgehalt, das zusätzlich in allen Calluskulturen den Serpentingehalt der Pflanze übertrifft.

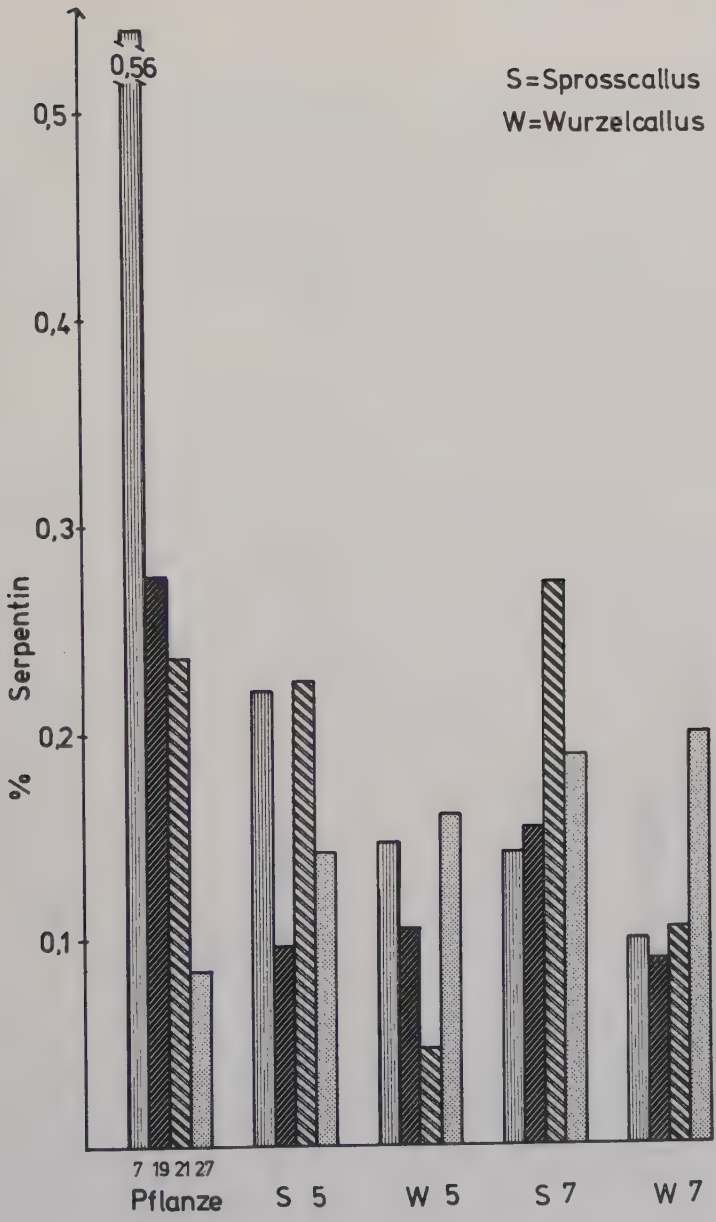


Abbildung 22

Medium A_R : Abbildung 23

Das Gewebe Nr. 27 verhält sich auf dem A_R -Medium wie beim G_{20} -Medium beschrieben. Die übrigen Gewebe erreichen nicht die Serpentinkonzentrationen des G_{20} -Mediums. Die Sprossgewebe 7 und 19 erreichen höhere Werte als die Gewebe Nr. 21 und 27; bei den Wurzelgeweben produzieren die Gewebe 19 und 27 das meiste Serpentin, das nach 7 Wochen Versuchsdauer das Doppelte der Ernte nach 5 Wochen erreicht.

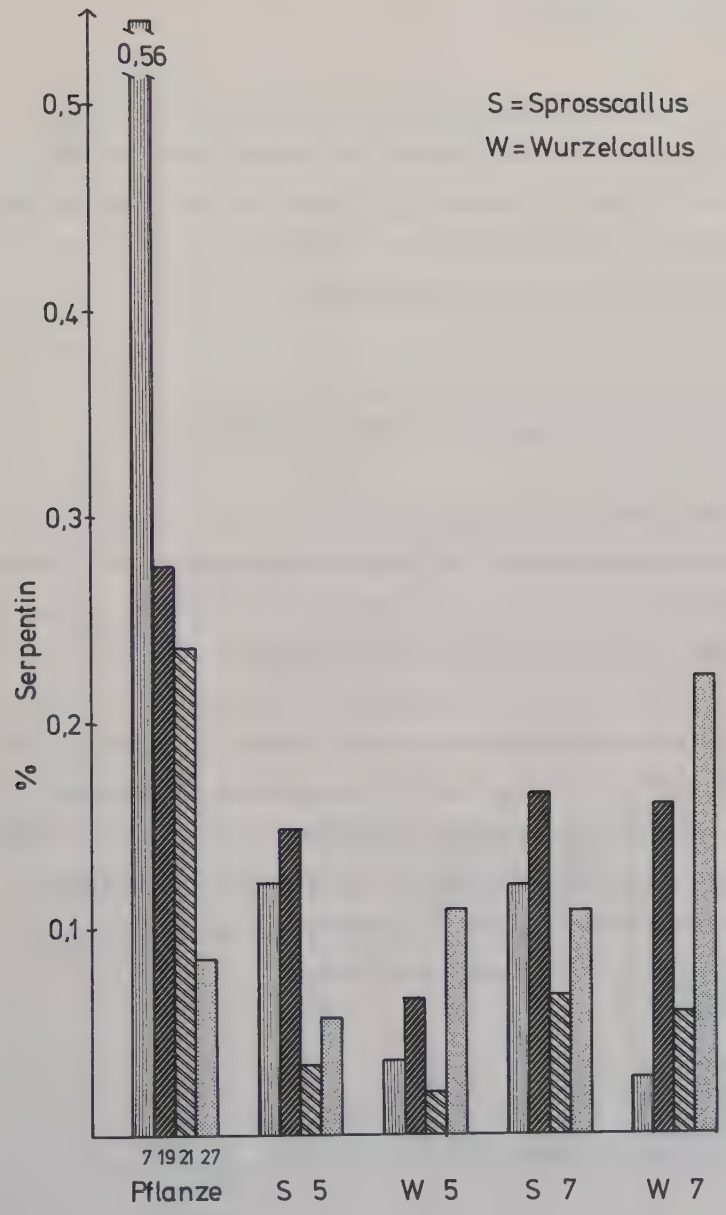


Abbildung 23

Medium G_{48} : Abbildung 24

Auf allen 3 Medien zeigt das Wurzelgewebe der Pflanze mit geringstem Alkaloidgehalt den höchsten Serpentingehalt, und bis auf das Gewebe Nr. 7 nach 5 Wochen wird auf dem G_{48} -Medium in den Wurzelcalli weniger Serpentin als in den Sprosscalli gebildet. Auch hier zeigen sich keine Parallelen zwischen Pflanzen- und Gewebegehalt.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Wurzelkulturen:

Nach 5 Wochen Wachstum produzieren die Wurzelkulturen auf dem G_{20} -Medium das meiste Serpentin. Dies stimmt mit einem großen Teil der Sprossgewebe überein (Vgl. Abbildung 12). Nach 7 Wochen treten Unterschiede insoweit ein, als die Gewebe Nr. 19 und 27 auf dem A_R -Medium höhere Werte als auf den beiden anderen Nährmedien erreichen (Vgl. Abb. 9). Ansonsten zeigen die Wurzelcalli auf dem A_R -Medium im Gegensatz zu den Sprosscalli (Vgl. Abbildung 9 und 15) keinen erhöhten Serpentingehalt. Das Verhalten der Wurzelgewebe auf den Medien A_R und G_{48} nach 5 Wochen Wachstum ist identisch. Hohe Serpentinwerte erreichen die Wurzelcallus-kulturen also auf dem G_{20} -Medium, gewebebedingt auch auf dem A_R -Medium nach einer Versuchsdauer von 7 Wochen.

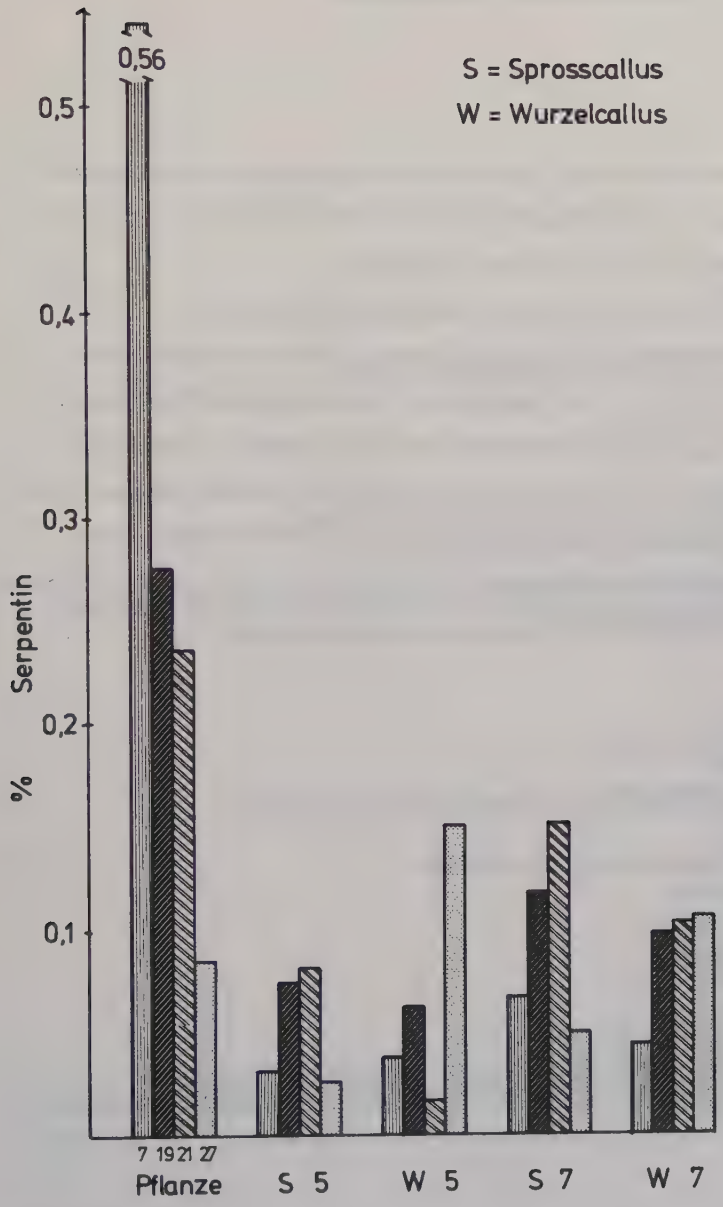


Abbildung 24

Licht-/Dunkelversuche an Sprosskulturen:

Es sollte weiterhin der Einfluß von Licht und Dunkel auf die Serpentinbildung in den Sprosscalluskulturen beobachtet werden. Die Versuche wurden auf dem A_R -Medium durchgeführt.

Hierzu wurden zunächst alle 28 Gewebe eine Passage lang im Dauerdunkel gehalten. Das Ergebnis dieser Untersuchung geht aus Abb. 25 hervor. Licht- und Dunkelwert wurden im Abstand von 4 Wochen ermittelt. Durchweg sind die Serpentingehalte in Geweben die ohne Lichteinwirkung wuchsen stark reduziert, wobei aber die Gewebe mit im Dauerlicht höheren Werten auch im Dauerdunkel noch den relativ höchsten Gehalt an Serpentin haben.

Abbildung 25

Werden die Gewebe 2 Passagen hintereinander ohne Lichteinwirkung gehalten, kann man an fast allen Beispielen ein weiteres Absinken der Serpentinkonzentrationen erkennen. Die beiden Vergleichsmessungen fanden im Abstand von 4 Wochen statt.
Abbildung 26.

Abbildung 26

Abbildung 27 gibt das Ergebnis folgender Untersuchung wieder: Eine Kolbenserie wurde geteilt, so daß die eine Hälfte im Dauerlicht, die andere Hälfte im Dauerdunkel wuchsen. Geerntet wurde nach einer Versuchsdauer von 4 Wochen und vorausgegangener Dunkelpassage. Auch in diesem Fall liegen die Serpentinwerte der Dunkelkulturen erheblich tiefer als die der Lichtkulturen.

Abbildung 27

Interessant erschien noch die Feststellung, wie sich Sprosscalluskulturen, die 4 Wochen lang im Dauerdunkel gezogen wurden, beim Vergleich der vorausgegangenen mit der sich anschließenden Passage im Licht verhalten. Abbildung 28 zeigt, daß Kulturen nach einer Dunkel- und sich anschliessenden Lichtpassage durchschnittlich noch einen niedrigeren Serpentingehalt aufweisen als Calli, die nur im Licht gehalten wurden.
Aus den 4 letztgenannten Versuchen geht hervor, daß die Serpentinproduktion in Sprosscalluskulturen im Licht wesentlich besser als unter Dunkeleinwirkung ist.

Zusammenfassung der Licht-/Dunkelversuche von Sprossgewebekulturen:

Calluskulturen bilden im Dauerdunkel wesentlich weniger Serpentin als im Licht. Werden die Gewebe über 2 Passagen hinweg im Dunkeln gezogen, sinkt der Serpentingehalt weiterhin ab, teilweise kann Serpentin nur noch in Spuren oder nicht mehr nachgewiesen werden. Auch bei einer sich nach einer Dunkelpassage anschließenden Passage im Licht erreichen nicht mehr alle Gewebe den Gehalt an Serpentin, den sie ohne Dunkeleinwirkung hatten. Bei der Kultivierung im Dunkeln kommt es verglichen mit der Lichtkultur zu keiner Änderung im Calluswachstum, allerdings verlieren die Gewebe allmählich ihre grüne Farbe, es wird kein Chlorophyll mehr gebildet (31).

Abbildung 28

Wachstum:

Die Gewebe zeigen auf den einzelnen Medien nicht nur ein recht unterschiedliches Verhalten was die Serpentinproduktion betrifft, sondern auch das Wachstum der Zellverbände wird beeinflußt.

Die Abbildungen 29, 30 und 31 zeigen dies bei drei Sprossgeweben (Nr. 7, 19 und 27), die wöchentlich geerntet, getrocknet und gewogen wurden. Verglichen wird das Wachstum auf den Medien G_{20}, A_R und F_1 angegeben in g Trockengewicht.

Auf den Medien F_1 und A_R setzt ab der 2. Woche bis zur 10. Woche ansteigend das Wachstum ein. Das Gewebe wächst dabei auf dem F_1 -Medium besser als auf dem A_R -Medium. Auf dem Medium G_{20} setzt eine langsame Zunahme des Gewichts erst in der 5. bzw. 6. Woche ein, die in der 10. Woche wieder abfällt.

Gewebe Nr. 19 wächst zwar auf den Medien F_1 und A_R am besten, hier tritt aber ab der 3. Woche ansteigend auch auf dem G_{20} -Medium verstärktes Wachstum ein (Abbildung 30).

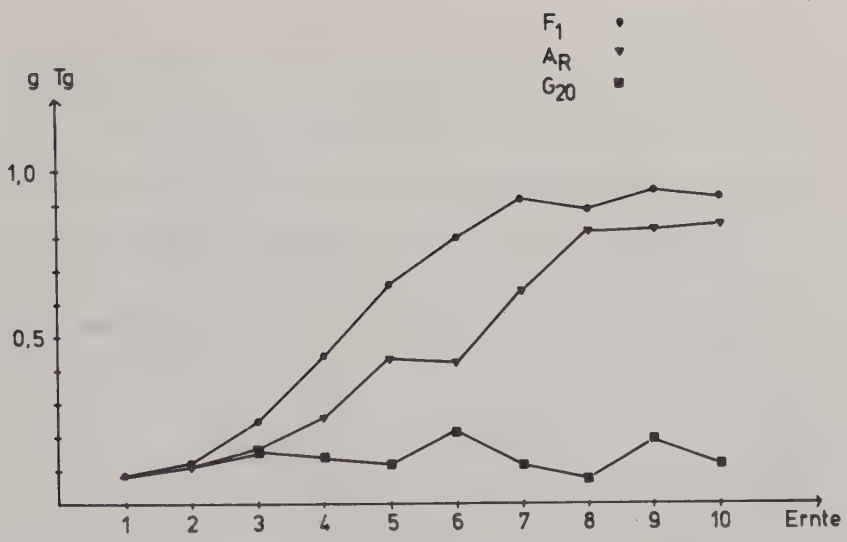

F1
AR
G20
g Tg
1,0
0,5
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Ernte

Abb. 29

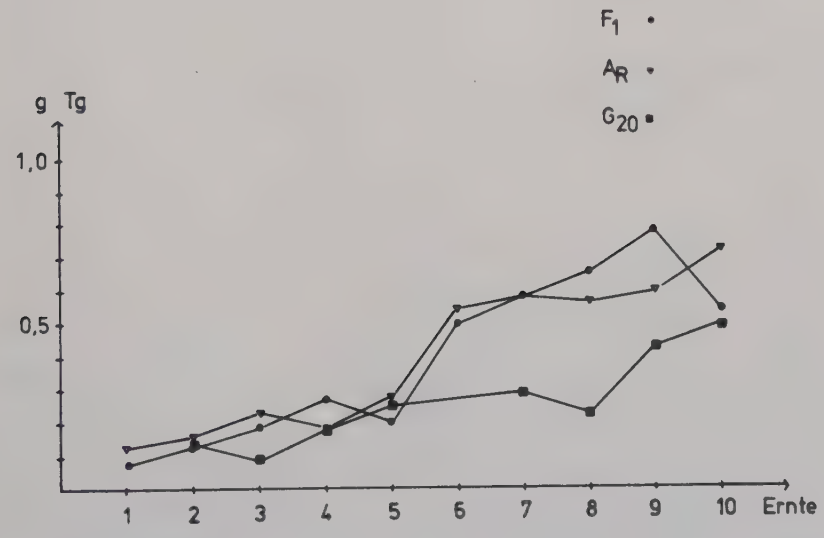

F1
AR
G20
g Tg
1,0
0,5
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Ernte

Abb. 30

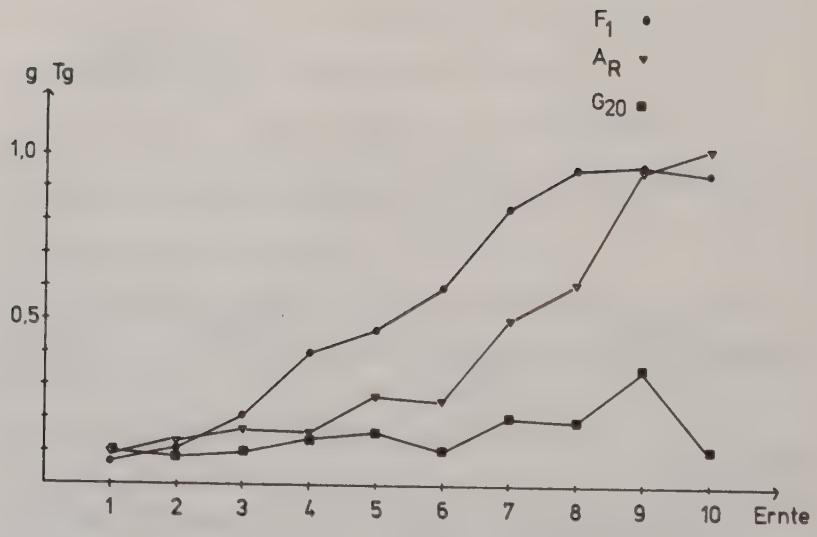


Abbildung 31

Die drei Abbildungen 32, 33 und 34 geben den Vergleich der Wachstumskurven von Sprosscalluskulturen und Wurzelcalluskulturen derselben Pflanze auf dem Medium A_R über eine Zeit von 10 Wochen wieder. Anhand aller Beispiele läßt sich erkennen, daß das Wurzelgewebe ab der 8. Woche nicht so gut wie das Sprossgewebe wächst. Der größte Unterschied zeigt sich ab der 5. Woche bei Gewebe Nr. 19 (Abbildung 33), während sich die Gewebe 7 (Abbildung 32) und 27 (Abbildung 34) bis zur 7. Woche ähnlich verhalten.

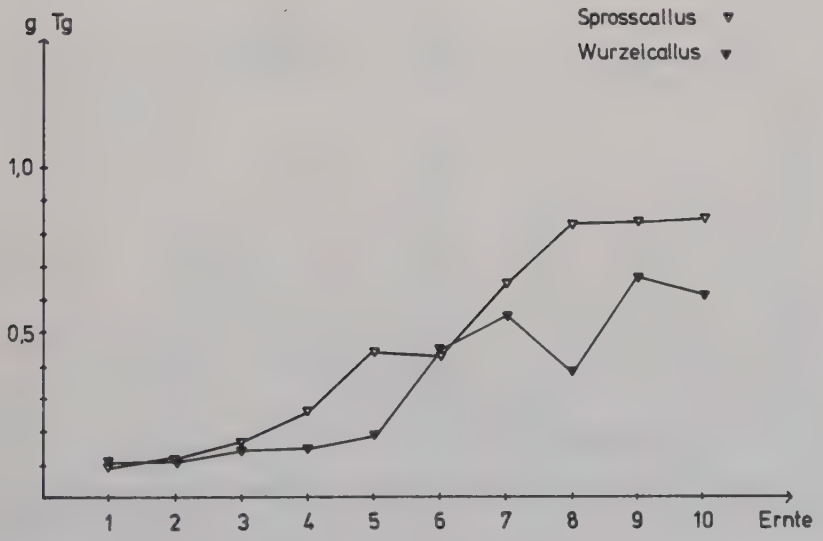


Abbildung 32

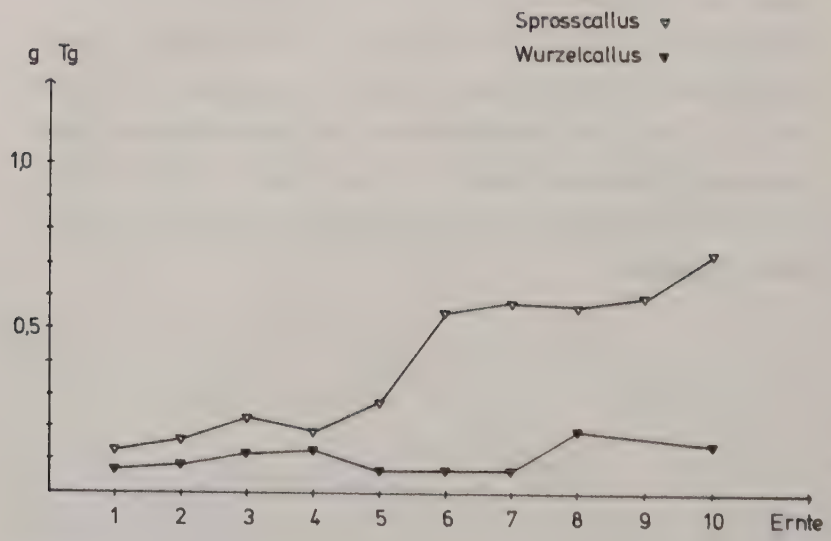


Abbildung 33

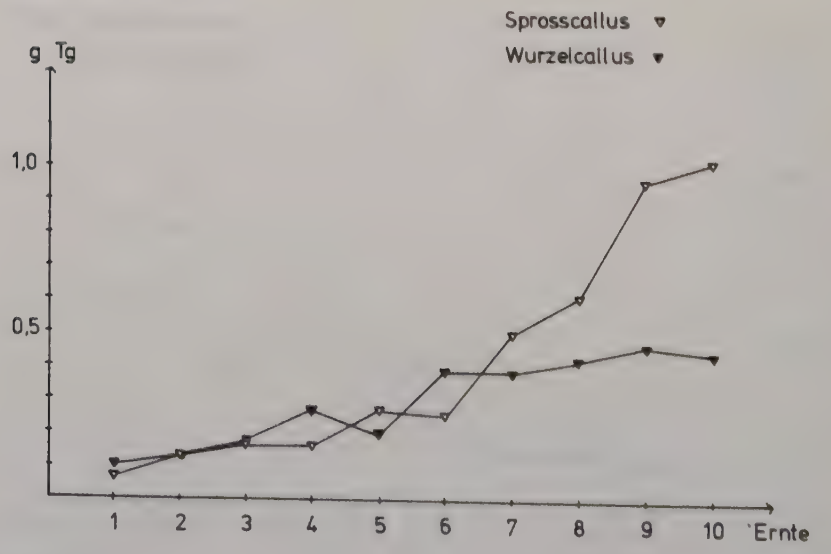


Abbildung 34

Für eine hohe Serpentinausbeute kommt es nicht allein auf hohe Serpentinkonzentrationen an, sondern es muß auch noch das Wachstum auf dem verwendeten Medium berücksichtigt werden. Ein Medium, auf dem ein Gewebe gut wächst aber zu einem geringen Prozentsatz Serpentin bildet, kann unter Umständen günstiger für eine hohe Serpentinausbeute sein, als ein Medium, auf dem Gewebekulturen zwar mehr Alkaloid produzieren, aber nur schlecht wachsen.
Um darüber eine Aussage machen zu können wurde zunächst das Trockengewicht, angegeben in g, nach einer Versuchsdauer von 5 und 7 Wochen auf den Medien G_{20}, A_R und G_{48} bestimmt.

Abbildung 35 gibt das Trockengewicht der Sprossgewebe der 4 ausgewählten Pflanzen wieder.
Die Calli wachsen auf dem Medium G_{48} am besten, das Wachstum auf den Medien G_{20} und A_R ist vergleichbar. Von der 5. zur 7. Woche ist ein Zuwachs zu beobachten.

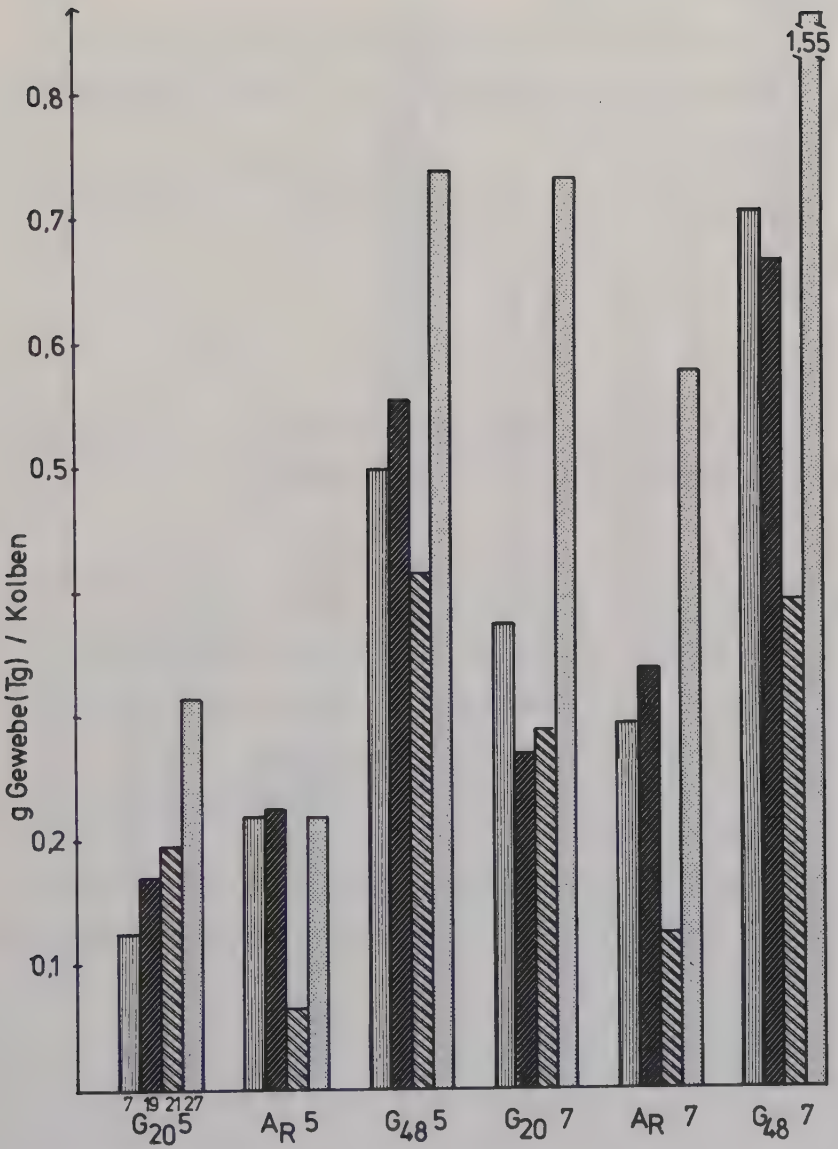


Abbildung 35

In Abbildung 36 sind die entsprechenden Angaben der Wurzelcallus-kulturen dargestellt.

Auch hier übertrifft das Wachstum auf dem Medium G_{48} das auf den beiden Medien G_{20} und A_R. Von der 5. zur 7. Woche erfolgt ein Zuwachs auf allen drei Medien.

Sowohl das Spross- als auch das Wurzelgewebe Nr. 27 zeigt in fast allen Beispielen das beste Wachstum.

Zusammenfassung der Einflüsse der Medien F_1, G_{20}, A_R und G_{48} auf das Wachstum von Spross- und Wurzelkulturen:

Abgesehen von der oben erwähnten Feststellung, daß das Wachstum gewebebedingt unterschiedlich sein kann, (wie bei Wurzel Gewebe Nr. 27, vgl. Abbildung 38) zeigt sich auf dem G_{48} -Medium bei allen Calli von Spross und Wurzel das beste Wachstum. Die Sprosskulturen wachsen auch auf dem halbsynthetischen F_1 -Medium gut.

Das Wachstum der Wurzelkulturen ist auf dem G_{20} -Medium etwas besser als auf dem Medium A_R.

Bei den Sprosscalluskulturen ist nach 7 Wochen auf dem G_{20} -Medium, nach 5 Wochen auf dem A_R -Medium das bessere Wachstum zu beobachten.

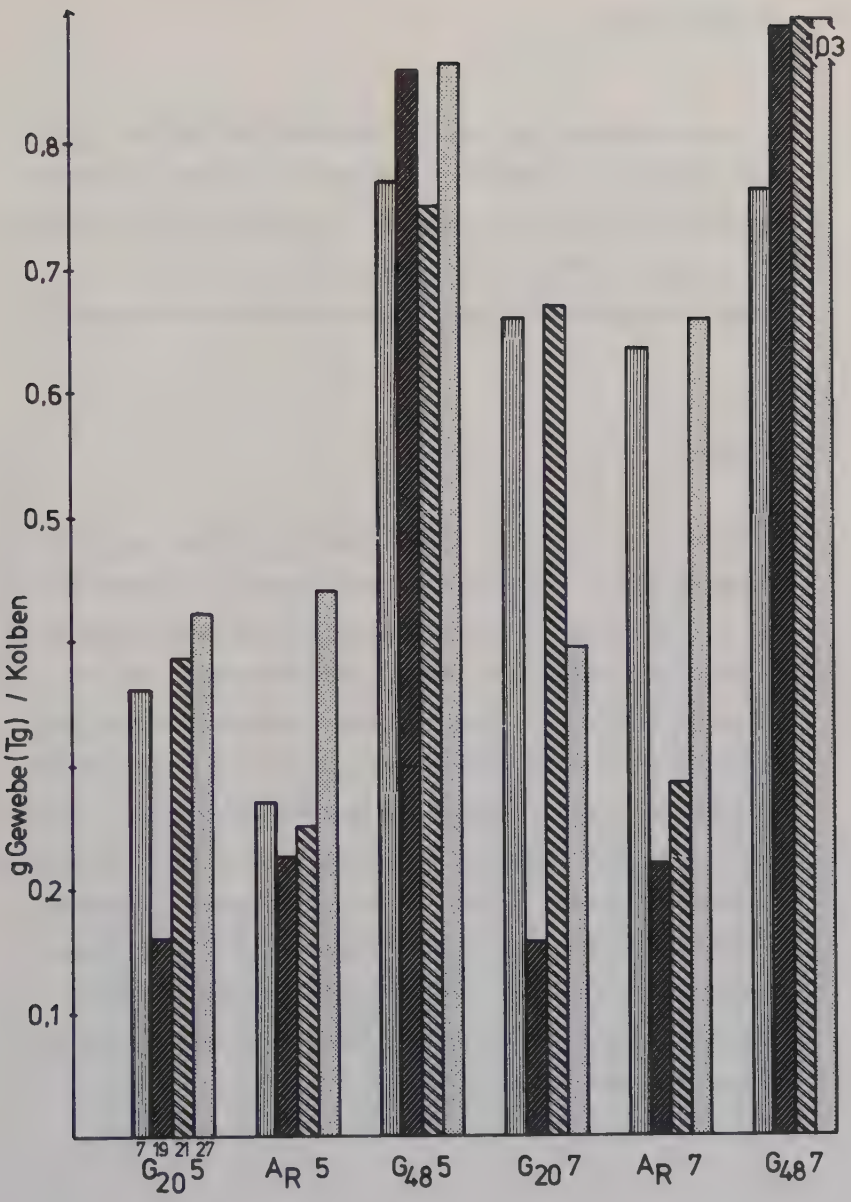


Abbildung 36

Serpentinausbeute:

Wird nun das Wachstum und der Serpentingehalt einer Calluskultur auf einem Medium berücksichtigt, läßt sich eine Aussage über die Serpentinausbeute pro Kolben machen, dargestellt in Abbildung 37 auf die Sprosscalli bezogen, in Abbildung 38 die Wurzelcalli betreffend.
Die Serpentinausbeute ist in µg Serpentin/Kolben Nähragar angegeben.

Sprosscalli:

Die Gewebe Nr. 21 und 27 erreichen auf dem G_{20} -Medium nach 5 und 7 Wochen das Maximum. Auf dem A_R -Medium erreichen die Gewebe Nr. 7 und 19, nach 7 Wochen auch das Gewebe Nr. 27 gute Serpentinausbeuten. Durch das gute Wachstum auf dem G_{48} -Medium wird eine geringere Serpentinkonzentration ausgeglichen, und die Serpentinausbeute verbessert. So erhält man auf dem Medium G_{48} nach einer Versuchsdauer von 7 Wochen bei allen 4 Geweben sehr gute Serpentinausbeuten, die nur von den Geweben Nr. 21 und 27 auf dem G_{20} -Medium nach 7 Wochen übertroffen werden, wobei aber auch hier Calli von Pflanzen mit mittlerem und niedrigem Ausgangsgehalt eine bessere Serpentinausbeute zeigen als Calli von der Pflanze mit dem relativ höchsten Serpentingehalt.
Nach 5 und 7 Wochen sind die Serpentinausbeuten auf dem Medium G_{48} besser als auf dem Medium A_R.

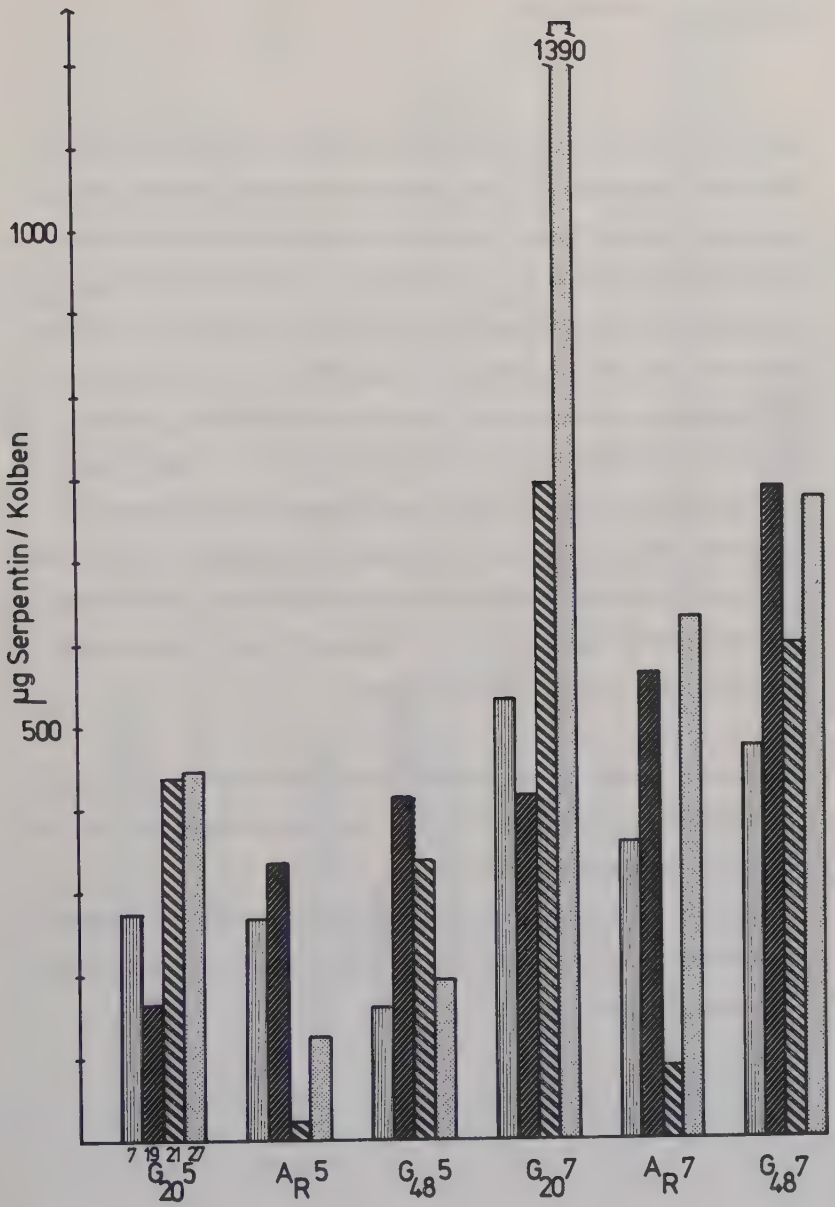


Abbildung 37

Wurzelcalli: Abbildung 38

Auf allen drei Medien und unabhängig von der Versuchsdauer zeigt das Wurzelgewebe (Nr. 27) der Pflanze mit dem niedrigsten Ausgangsgehalt die höchsten Serpentinausbeuten, besonders auf dem Medium G_{48} nach 5 und dem Medium A_R nach 7 Wochen, das entsprechende Sprossgewebe nur bei der Ernte nach 7 Wochen. Dies ist auf das extrem starke Wachstum dieser Gewebe-Nummer zurückzuführen. Die restlichen drei Wurzelkulturen erreichen nach 5 und 7 Wochen auf dem G_{20} -Medium hohe Serpentinausbeuten. Dabei wird von Gewebe Nr. 7, der Pflanze mit dem höchsten Gehalt eine relativ gute Serpentinausbeute erhalten. Diese Alkaloidausbeuten werden vom Medium G_{48} ebenfalls nach 7 Wochen übertroffen, allerdings erreichen hier wieder die Gewebe der Pflanzen mit niedrigerem Ausgangsgehalt die besseren Werte. Die Serpentinausbeuten auf dem A_R -Medium sind geringer.

Diese Ausführungen zeigen, daß für eine gute Serpentinausbeute neben der Alkaloidbildung, ausgedrückt in %, auch das Wachstum der einzelnen Zellverbände ausschlaggebend ist.
Das Medium G_{48} zeichnet sich durch starkes Zellwachstum aus, bedingt durch den Zusatz von 0,1 mg/L 2,4-D. Dadurch werden hohe Serpentinausbeuten erhalten.

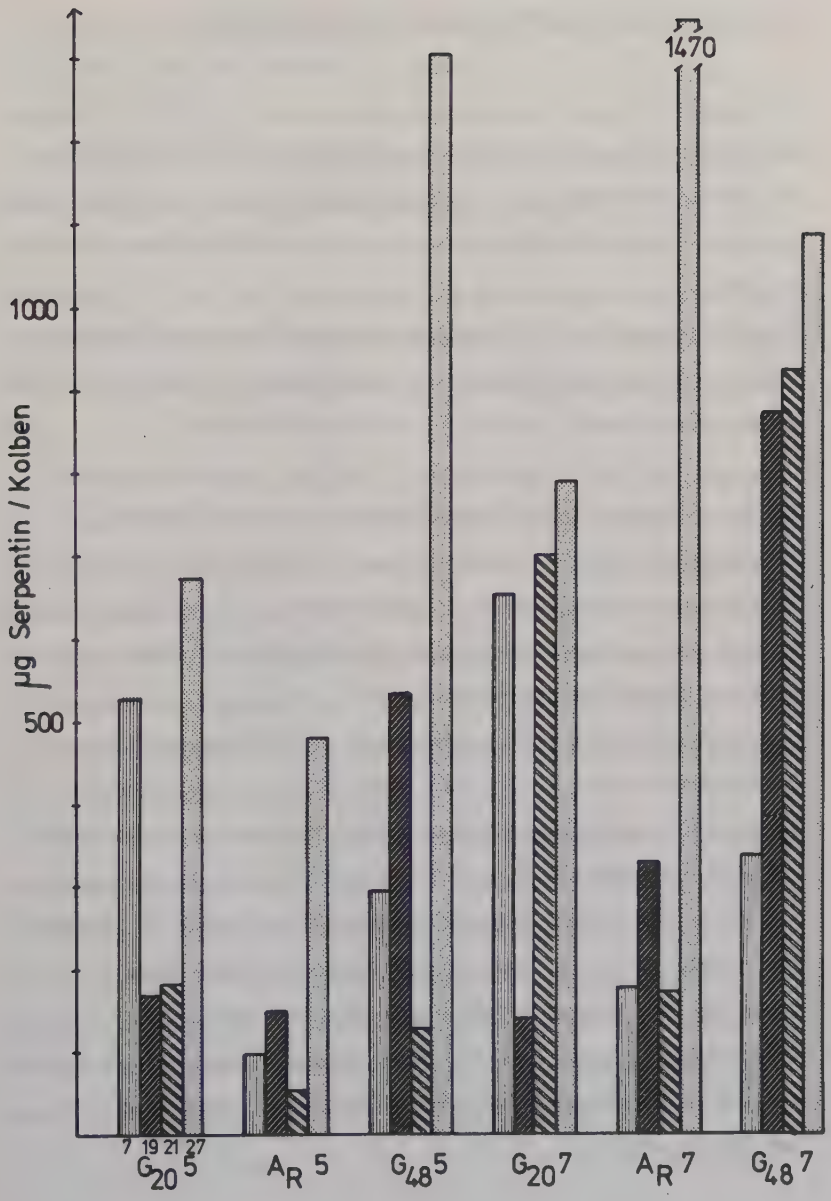


Abbildung 38

ABSCHLIESSENDE ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION:

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin festzustellen, ob sich zwischen der Alkaloidproduktion in der ausdifferenzierten Wurzel und dem Alkaloidbildungsvermögen von entsprechend angelegten Gewebekulturen Parallelen ergeben.
Es galt zu beobachten, ob Pflanzen mit hohem, mittlerem bzw. niederem Gehalt an Serpentin und Raubasin diese "Information" - hoher bzw. geringer Alkaloidgehalt - in den Calluskulturen beibehalten.

Das Screening der Wurzeln lieferte Pflanzen von hohem bis niedrigem Alkaloidgehalt, der in den Bereichen von 0,2 % bis 1,7 % lag. Diese Schwankungen in bezug auf die Alkaloidproduktion sind primär pflanzenbedingt, also genetisch fixiert. Zusätzlich beeinflußt das Alter bei der Ernte der Wurzeln den Alkaloidgehalt (37).
Da es sich bei pflanzlichen Gewebekulturen jedoch meist nicht um ausdifferenzierte Gewebe sondern um weitgehend embryonal gewordene Zellen, die einen Wundcallus bilden handelt, erscheint es verständlich, daß ein Callus nicht dieselben Inhaltsstoffe bilden muß wie das Organ, von dem er ursprünglich stammte. Da aber die Zellen einer Gewebekultur grundsätzlich noch alle genetischen Potenzen der Ausgangspflanze besitzen (38, 39), sollten die Calli allerdings dazu in der Lage sein. Diese Omnipotenz aller Zellen einer Pflanze wurde damit belegt, daß aus Calluskulturen, aus einzelnen Zellen oder aus Protoplasten wieder ganze Pflanzen regenerierten.

Im Gegensatz dazu stehen die Versuche von WEST und MIKA (28), die Atropin nur in Wurzelcalluskulturen, nicht aber in Blatt- und Stengelkulturen von Atropa belladonna nachweisen konnten. Auch STOUTEMEYER und BRITT (40) stellten an zwei Gewebekulturen von Jugend- und Altersblättern des Efeus unterschiedliche Wachstumsraten fest.

Über das Vorkommen von Alkaloiden in Oberflächenkulturen von Catharanthus roseus berichteten zuerst BABCOCK and CAREW (6). HARRIS et al fanden Alkaloide in Oberflächen- und Suspensionskulturen, ebenso im Nährmedium (40).
1965 stellten RICHTER et al fest (14), daß callusartige Blatt- und Stengelgewebe von Catharanthus roseus prinzipiell zur Alkaloidsynthese befähigt sind. Sie fanden Vindolin und Vindolinin in Blatt-, Stengel- und Wurzelcalli in verschieden hohen Konzentrationen. CAREW and PATTERSON konnten in Geweben von Blättern und Keimlingen und im Nährmedium von Catharanthus roseus Gewebekulturen das Vorkommen grundsätzlich derselben Alkaloide, unter anderem auch Serpentin und Raubasin feststellen (42).
Sowohl in den Spross- als auch in den Wurzelkulturen konnten wir Serpentin und Raubasin nachweisen, allerdings zu einem wesentlich geringeren Prozentsatz - bezogen auf das Trockengewicht - als in der Wurzel. Raubasin kam in den Gewebekulturen nur in Spuren vor. Damit ist Catharanthus roseus ein weiteres Beispiel dafür, daß die Dedifferenzierung zur Gewebekultur mit einem mehr oder weniger großen Verlust der Bildung von sekundären Pflanzenstoffen einhergeht (43).

Umso interessanter wird die Aussage, ob Pflanzen mit hohem Serpentin- und Raubasingehalt auch in Stengel- und Wurzelkulturen vergleichbare Mengen an Alkaloid produzieren. Ein erstes Ergebnis lieferte die Abb. 3. Die Pflanze mit dem höchsten Serpentingehalt bildet auch im Sprosscallus am meisten Serpentin. Aber auch die Pflanze mit dem niedrigsten Ausgangsgehalt bildet relativ mehr Serpentin als ihrer Anordnung im Histogramm nach zu erwarten gewesen wäre, und übertrifft damit sogar den Serpentingehalt der Wurzel. Auch die Werte der übrigen Gewebe zeigen keinerlei Ähnlichkeit mit dem Alkaloidgehalt in der Pflanze. Es ist sogar festzustellen, daß Calluskulturen von Pflanzen mit weniger hohem Ausgangsgehalt bessere Serpentinwerte erreichen als Gewebekulturen von Pflanzen mit hohem Serpentingehalt.

Um dieses erste Ergebnis zu überprüfen und um allgemein einen höheren Alkaloidgehalt zu erreichen, wurden die Calluskulturen auf drei verschiedenen Medien, die sich bei vorangegangenen Untersuchungen als die Serpentinproduktion günstig beeinflußend herausgestellt hatten, nach einer Versuchsdauer von 5 und 7 Wochen geerntet.

Dabei stellte sich heraus, daß zwar die Pflanze mit hohem Ausgangsgehalt unter bestimmten Bedingungen auch im Gewebe die relativ höheren Serpentinkonzentrationen aufweist (vgl. Abbildung 5, 6, 9 und 10), daß aber auch Gewebe von Pflanzen mit mittleren und niedrigen Ausgangsgehalten prozentual mehr Serpentin bilden als Gewebe von Pflanzen mit hohem Serpentingehalt in der Wurzel. Parallelen in bezug auf die Alkaloidbildung stellen sich also nur insofern ein, als auf manchen Medien, die die Serpentinproduktion durch eine günstige Wuchsstoffkombination fördern, die Pflanze mit dem höchsten Ausgangsgehalt auch im Gewebe relativ viel Serpentin produziert, z. B. 0,5 % nach 5 und 7 Wochen Versuchsdauer auf dem A_R -Medium (vgl. Abbildung 13) oder 0,15 % und 0,25 % nach

5 und 7 Wochen auf dem G_{48} -Medium (vgl. Abbildung 14).
Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, daß einzelne Pflanzen mit geringerem Ausgangsgehalt auf den verschiedenen Medien auch ähnlich hohe Serpentinwerte erreichen (vgl. Abbildung 4, 5, 8 und 9). Dabei handelt es sich allerdings nicht immer um das Gewebe derselben Pflanze, so daß eine verstärkte Alkaloidbildung sowohl von der Calluskultur selbst als auch vom verwendeten Nährmedium und der Versuchsdauer abhängt. Daraus kann gefolgert werden, daß zwar Pflanzen mit hohem Ausgangsgehalt die Anlage haben können in Geweben viel Serpentin zu bilden, daß aber auch ebenso gute Werte von Pflanzen mit mittlerem bzw. niedrigem Ausgangsgehalt erreicht werden können. Zudem kann auch ein Medienwechsel Änderungen der Konzentrationsverhältnisse von Serpentin in den Calluskulturen bewirken. ZENK et al (44) konnten bei verschiedenen Stämmen von Catharanthus roseus Suspensionskulturen unterschiedlich hohe Serpentinkonzentrationen feststellen. Außerdem fanden ZENK et al, daß zwei Zellstämme, die von derselben Kultur abstammten auf eine Tryptophanzugabe unterschiedlich reagierten.
Allgemein die höchsten Werte an Serpentin in den Sprosscalli erhält man nach einer Versuchsdauer von 7 Wochen auf dem modifizierten Medium nach Nitsch und Nitsch, A_R (25), und nach 5 Wochen Versuchsdauer auf dem modifizierten Medium nach Murashige und Skoog, G_{20} (24).
Außer auf dem Medium G_{20}, auf dem die Hälfte aller Sprosscalli nach 5 Wochen höhere Werte als nach 7 Wochen erreicht, ist die Ernte auf den Medien A_R und G_{48} nach 7 Wochen günstiger.
Auch die Wurzelkulturen lassen keinen Vergleich zwischen Pflanzen- und Gewebegehalt zu. Die Alkaloidbildung ist hier ebenso von Medium zu Medium und von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich. Die höchsten Serpen-

tinwerte erhält man nach 5 Wochen auf dem G_{20} -Medium oder teilweise nach 7 Wochen auf dem A_R -Medium. Identisch mit den Sprosscalluskulturen verhalten sich die Wurzelkulturen, was die Versuchsdauer anbelangt. Auf dem G_{20} -Medium fallen die Werte von 5 Wochen nach 7 Wochen ab. Auf dem A_R -Medium ist bei der Hälfte der Wurzelkulturen, auf dem G_{48} -Medium bei allen vier Wurzelcalli ein Anstieg der Serpentinwerte nach 7 Wochen zu verzeichnen.

Beim Vergleich von Licht- und Dunkelversuchen ist ein starkes Absinken der Serpentinwerte im Dunkeln zu beobachten, das bei sich direkt anschließenden Dunkelpassagen zum totalen Verlust der Serpentinbildung führen kann. Auch nach einer auf eine Dunkelpassage folgende Passage im Licht werden nicht von allen Kulturen wieder die Werte erreicht, die ohne Dunkeleinwirkung gemessen werden konnten (vgl. Abbildung 25, 26, 27, 28).

Das Wachstum der Gewebe wird von den einzelnen Medien unterschiedlich beeinflußt. Auf den Medien G_{48} (24) und F_1 (26) ist das beste Wachstum zu beobachten, wobei das G_{48} -Medium als vollsynthetisches Medium vorzuziehen ist. Auch auf den Medien A_R und G_{20} findet eine Zunahme des Trockengewichts statt, die Gewebe wachsen auf dem A_R -Medium teilweise besser als auf dem G_{20} -Medium.

Letztlich läßt das Wachstum unter Berücksichtigung des Alkaloidgehalts der Calluskulturen eine Aussage über die Serpentinausbeute pro Kolben zu. Hierbei konnte festgestellt werden, daß das G_{48} -Medium durch besonders gutes Wachstum bessere Serpentinausbeuten liefert als die Medien A_R und G_{20}, auf denen prozentual mehr Serpentin gebildet wird. Diese Aussage ist für Spross- und Wurzelkulturen gleichermaßen zutreffend. Auch hier zeigt der Vergleich, daß der Alkaloidgehalt einer Pflanze nicht mit der Serpentinausbeute / Kolben korrelieren muß.

LITERATURVERZEICHNIS

1 NOBLE, R.L., BEER, C.T., CUTTS, J.H. (1958), Ann. New York Acad. Sci. 76, 882

2 CAREW, D.P. and STABA, E.J. (1965), Plant tissue culture: Its fundamentals, application and relationship to medical plant studies. Lloydia 28, 1 - 26

3 REINHARD, E. (1967) Probleme der Produktion von Arzneistoffen durch pflanzliche "Gewebekulturen". Dt. Apothekerzeitung 107, 1201 - 1207

4 BAJAJ, Y.P.S. und BOPP, M. (1971) Gewebekulturen in der Angewandten Botanik. Angew. Botanik 45, 115 - 151

5 HILDEBRANDT, A.C., RIKER, A.J., WATWETOR, J.L. (1954) Growth and inhibition of tissue cultures on media with different concentrations of organic acids. Phytopathology 44, 422 - 428

6 BABCOCK, Ph. A. and CAREW, D.P. (1962) Tissue Culture of the Apocynaceae. I. Culture requirements and alkaloid analysis. Lloydia 25, 209 - 213

7 MAHLBERG, P. (1967) Organ formation in callus tissues of Vinca rosea. in vitro 2, 29

8 WOOD, H.N. and BRAUN, A.C. (1961) The regulation of certain

essential biosynthetic systems in normal and crown-gall tumor cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 1907 - 1913

9 CAREW, D.P. and PATTERSON, B.D. (1970) The effects of antibiotics, on the growth of Catharanthus roseus tissue cultures. Lloydia 33, 275 - 277

10 GOLDMANN-MENAGE, A. (1970) Recherches sur le metabolisme azote des tissue de crown-gall cultives in vitro. Ann. Sci. Nat., Bot. biol. veg. 11, 223 - 309

11 WOOD, H.N., LIN, M.C., BRAUN, A.C. (1972) The inhibition of plant and animal adenosine 3':5' -cyclic monophosphate phosphodiesterase by cell-division-promoting substance from tissues of higher plant species. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 69, 403 - 406

12 KOBLITZ, H. (1969) Enzymologische Untersuchungen an pflanzlichen Gewebekulturen. 2. Die Wirkung von Gibberelinsäure und Chlorcholinchlorid auf die Aktivität einiger Fermentsysteme in vitro kultivierter Pflanzengewebe. Biol. Zbl. 88, 409 - 423

13 HOFMANN, H., WAGNER, I. HOFFMANN-OSTENHOF, O. (1969) Über ein lösliches Enzym aus Vinca rosea, das myo-Inosit zu L-Bornesit methyliert. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 350, 1465 - 1468

14 RICHTER, I., STOLLE, K., GRÖGER, D., MOTHES, K. (1965) Über die Alkaloidbildung in Gewebekulturen von Catharanthus roseus G. Don. Naturwissenschaften 52, 305 - 306

15 PATTERSON, B. and CAREW, D.P. (1967) Growth and alkaloid formation in Catharanthus roseus tissue cultures. In vitro 2, 28

16 - - (1969) Growth and alkaloid formation in Catharanthus roseus tissue cultures. Lloydia 32, 131 - 140

17 GARNIER, J. et MOREL, G. (1972) Influence des conditions de culture des tissus de Vinca rosea L. sur la production d'alcaloides totaux. Physiol. veg. 10, 617 - 625

18 PETIARD, V. et DEMARLY, Y. (1972) Mise en evidence de glucosides et d'alcaloides dans les cultures de tissus vegetaux. Ann. Amelior. Plantes 22, 361 - 374

19 KOBLITZ, H. (1972) Zell- und Gewebezüchtung bei Pflanzen, Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart

20 NEUMANN, K.H., De GARCIA, H. (1974) Über den Einfluß der Saccharosekonzentration auf die Entwicklung von Embryonen aus Zellsuspensionen von Daucus carota L. . Z. Pflanzenphysiol. 74, 85 - 90

21 STEWARD, F.C. (1969) Plant Physiology, Volume B, Academic Press, New York

22 MATHES, C.M. (1967) The in vitro growth of Acer saccharum and Acer pennsylvanicum callus tissue. Canad. J. Bot. 45, 2195 - 2200

23 TULECKE, W. and NICKELL, L.G. (1959) Production of large amounts of plant tissue by submerged culture. Science 130, 836

24 MURASHIGE and SKOOG (1962), Physiol. Plant 15, 473

25 NITSCH, J.P. and NITSCH, C. (1969), Science 163, 85 - 86

26 WHITE, P.R. (1943), A Handbook of Plant Tissue Cultures, Lancaster

27 CAREW, P.D. (1966) Growth of Callus Tissue of Catharanthus roseus in Suspension Culture, Journal of Pharmaceutical Sciences, 55, 1153 - 1154

28 WEST, F.R. and MIKA, E.S. (1957) Synthesis of Atropin by isolated roots and root callus cultures of Atropa belladonna. Bot. Gaz. 119, 50 - 54

29 VERZAR-PETRI, G. (1971) Incorporation of 2-^{14}C Sodium Acetate into the Alkaloids of Vinc minor L. . Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae 22, 413 - 422

30 FLOSS, H.G., ROBBERS, J.E., HEINSTEIN, P.F. (1974) Regulatory Control Mechanisms in Alkaloid Biosynthesis. in : Metabolism and Regulation of Secondary Plant Products. RUNECKLES, V.C., CONN, E.E. (eds.) Rec. Adv. in Phytochem. 8, Acad. Press, New York

31 ALFERMANN, A.W. (1973) Dissertation Tübingen

32 VERZAR-PETRI, G. (1970) Localization of Alkaloids in Plant Cells Acta biol. Acad. Sci. hung., 21 (2), 187 - 191

33 YODER, L.R. and MAHLBERG, P.G. (1976) Reactions of Alkaloid and Histochemical Indicators in Laticifers and specialized Parenchyma cells of Catharanthus roseus (Apocynaceae). Amer. J. Bot. 63 (9), 1167 - 1173

34 TUNMANN, D., ROSENTHALER, L. (1931) Pflanzenmikrochemie. Bornträger, Berlin

35 MOTHES, K. (1966) Bemerkung zur Biologie d. Alkaloide Abh. d. D. Acad. Wiss. 3. Intern. Symp. Biochem. u. Phys. d. Alkaloide. Acad. Verl., Berlin

36 NEUMANN, D., MÜLLER, E. (1967) Intrazellulärer Nachweis von Alkaloiden in Pflanzenzellen im licht- u. elektronenmikroskopischen Maßstab. Flora (A) 158, 479 - 491

37 MOTHES , K., RICHTER, I., STOLLE, K. und GRÖGER, D. (1965) Physiologische Bedingungen der Alkaloidsynthese bei Catharanthus roseus G. Don. Die Naturw. 52, 431

38 HABERLAND (1902)

39 STREET, H. E. and HENSHAW, G. G. (1966) Introduction and methods employed in plant tissue cultures. ibid 459 - 532

40 STOUTEMEYER, V. T. and BRITT, O. K. (1965) The behaviour of tissue cultures from English and Algerian ivy in different growth phases. Amer. J. Bot. 52, 805 - 810

41 HARRIS, A. L., NYLUND, H. B. and CAREW, D. P. (1964) Tissue Culture Studies of Certain Members of the Apocynaceae. Lloydia 27, 322 - 327

42 CAREW, D. P. (1975) Tissue culture studies of Catharanthus roseus. In: The Catharanthus alkaloids. TAYLOR, W. I., FARNSWORTH, N.R. (eds.) 193 - 208, Marcel Dekker, New York

43 TEUSCHER, E. (1973) Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe mit Hilfe von Zellkulturen. Pharmazie 28, 6 - 18

44 ZENK, M. H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E. W. and DEUS, B. . Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus. In : Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application. BARZ, W., REINHARD, E., ZENK, M. H. (eds.) (1977) Springer-Verlag, 27 - 43, Berlin, Heidelberg, New York

LEBENSLAUF

Am 3. Mai 1949 wurde ich, Ursula Roller, als Kind des Kajus Roller, kaufm. Direktor, und seiner Ehefrau Helga, geborene Schliep-Gereke in Baden-Baden geboren und evangelisch getauft.
Nach einer vorübergehenden Tätigkeit meines Vaters in Ulm verzogen wir im Jahr 1951 nach Stuttgart, wo wir 20 Jahre wohnten. Im Oktober 1970 haben wir unseren Wohnsitz nach Aidlingen/Wttbg. verlegt.
Die Grundschule besuchte ich von 1955 bis 1959. Danach wechselte ich in das humanistische Hölderlin-Gymnasium für Mädchen über und wählte den neusprachlichen Zug. Meine Schulzeit habe ich nach neun Schuljahren im Juni 1967 mit der Reifeprüfung beendet.
Meiner Neigung folgend entschied ich mich für den pharmazeutischen Beruf und begann am 1. Oktober 1967 das Praktikum in der Waldau-Apotheke in Stuttgart-Degerloch. Nach zweijähriger Praktikantenzeit bestand ich im September 1969 die Pharmazeutische Vorprüfung in Stuttgart und arbeitete bis 31. März 1971 in meiner Lehrapotheke als vorexaminierte Praktikantin.
Im Sommersemester 1971 nahm ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen das Studium der Chemie auf und wechselte im Mai 1972 zum Fachbereich Pharmazie. Das Studium der Pharmazie beendete ich im März 1975 mit dem Staatsexamen. Im Mai 1975 begann ich am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Professor Dr. E. Reinhard mit der Arbeit "Über die Bildung der Indolalkaloide Serpentin und Raubasin in Wurzeln und Gewebekulturen von Catharanthus roseus (L.) G. Don", die ich im Oktober 1977 beendete. Während dieser Zeit war ich als wissenschaftliche Hilfskraft tätig.
Meine akademischen Lehrer waren außer Herrn Professor Dr. E. Reinhard die Herren Professoren und Dozenten:
H. Auterhoff, E. Graf, H. P. Ammon, K. A. Kovar, F. Moll, A. W. Alfermann, E. Mechler, H. Hamacher (Pharmazie), E. Bayer (Chemie), Bader (Hygiene), H. Krüger (Physik).